

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN DES
ANGIOTENSIN-CONVERTING-ENZYMES IN SEMINALPLASMA
UND BLUTSERUM BEIM MENSCHEN**

HARALD NIEDERHAUSER

1986

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der
Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Braun-Falco

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN DES
ANGIOTENSIN-CONVERTING-ENZYMES IN SEMINALPLASMA
UND BLUTSERUM BEIM MENSCHEN**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Harald Niederhauser

aus

München

Jahr

1986

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. W.-B. Schill

Prof. Dr. med. H. Dahlheim

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. med. h.c. O. Braun-Falco

Prof. Dr. med. H. Jahrmärker

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter:

Dr. phil. nat. F. Krassnigg

Dekan:

Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen

Prüfung:

02.04.1987

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Vorwort.....	1
1.2. Männliche Sterilität.....	1
1.3. Zielsetzung der Untersuchungen.....	4
2. BISHERIGE FORSCHUNGSERGEBNISSE.....	6
2.1. Geschichtlicher Rückblick.....	6
2.1.1. Das Renin-Angiotensin-System.....	6
2.1.2. Das Kallikrein-Kinin-System.....	7
2.1.3. Zusammenhang zwischen dem Renin-Angiotensin-System und dem Kallikrein-Kinin-System.....	9
2.2. Bedeutung des Angiotensin-converting-enzyme als Bindeglied zwischen dem Renin-Angiotensin-System und dem Kallikrein-Kinin-System.....	9
2.2.1. Reaktionsmechanismen.....	9
2.2.2. Das Angiotensin-converting-enzyme - Regulator des Gleichgewichts.....	13
2.3. Das Kallikrein-Kinin-System und Renin-Angiotensin- System und die menschliche Fortpflanzung.....	16
2.3.1. Das Kallikrein-Kinin-System.....	16
2.3.1.1. Bedeutung bei der Frau.....	16
2.3.1.2. Bedeutung für die Infertilität des Mannes.....	16
2.3.2. Das Renin-Angiotensin-System.....	17
2.3.2.1. Bedeutung bei der Frau.....	17
2.3.2.2. Bedeutung beim Mann.....	17
3. BESTIMMUNGSMETHODEN FÜR ANGIOTENSIN-CONVERTING-ENZYME....	19
3.1. Radiochemische Methoden.....	19
3.2. Photometrische Methoden.....	20
3.3. Immunologische Methoden.....	21
4. MATERIALIEN UND METHODEN.....	22
4.1. Verwendete Substanzen.....	22

4.2. Bestimmung des Angiotensin-converting-enzyme nach Cushman und Cheung.....	24
4.2.1. Herstellung des Substrats.....	24
4.2.2. Aufbereitung des biologischen Materials.....	25
4.2.3. Bestimmung der enzymatischen Aktivität von ACE.....	26
4.2.4. Auswertung des Tests.....	28
4.3. Charakterisierung der Bestimmungsmethode von Cushman et al.....	29
4.4. Quantitative Bestimmung des ACE in verschiedenen Körperflüssigkeiten.....	30
4.4.1. Seminalplasma bei Normozoospermie.....	30
4.4.2. Prä- und postoperatives Seminalplasma bei vasektomierten Patienten.....	30
4.4.3. Prostataexprimat bei Normozoospermie.....	31
4.4.4. "Gewaschene" Spermatozoen.....	31
4.4.4.1. Aufbereitung der Spermatozoen.....	31
4.4.4.2. Bestimmung der Spermatozoenzahl.....	33
4.4.5. Blutserum.....	34
4.5. Bestimmung der ACE-Aktivität in Membranvesikeln.....	35
4.5.1. Allgemeines über Seminalplasma-Membranvesikel.....	35
4.5.2. Isolierung der Membranvesikel.....	37
4.5.3. ACE-Bestimmung.....	37
4.6. Gelchromatographische Untersuchungen zur Verteilung der ACE-Aktivität im Seminalplasma.....	38
4.6.1. Gelfiltration von Membranvesikeln.....	39
4.6.1.1. Isolierte Membranvesikel.....	39
4.6.1.2. Untersuchung der Stabilität der Membranvesikel.....	39
4.6.1.3. Solubilisierung der Membranvesikel.....	40
4.6.2. Gelfiltration von Seminalplasma.....	40
4.6.3. Gelfiltration von Prostataexprimat.....	40
4.7. Vergleich der Eigenschaften des Angiotensin-converting- enzyme in Seminalplasma und Blutserum.....	41
4.7.1. Temperaturabhängigkeit der ACE-Aktivität.....	41
4.7.2. Einfluß verschiedener Substratkonzentrationen auf die ACE-Aktivität.....	41

4.7.3. Einfluß verschiedener Inhibitoren auf die ACE-Aktivität.....	42
4.7.3.1. Bradykinin.....	45
4.7.3.2. Kallidin.....	45
4.7.3.3. Methionylkallidin.....	46
4.7.3.4. Angiotensin I.....	46
4.7.3.5. Angiotensin II.....	47
4.7.3.6. Angiotensin III.....	47
4.7.3.7. D-Phenylalanyl-L-Phenylalanyl-L-Arginin- Chloromethylketon.....	48
4.7.3.8. Bradykinin Potentiator B.....	48
4.7.3.9. Bradykinin Potentiator C.....	49
4.7.3.10. Methionin-Enkephalin.....	49
4.7.3.11. Bestatin.....	50
4.7.3.12. Neurotensin.....	50
4.7.3.13. Zincov ^R	51
4.8. Statistische Analyse.....	52
5. ERGEBNISSE.....	53
5.1. Charakterisierung der ACE-Bestimmung nach Cushman et al.....	53
5.1.1. Linearität.....	53
5.1.2. Reproduzierbarkeit.....	55
5.1.3. Interassay-Genauigkeit.....	56
5.2. Quantitative Bestimmung des ACE in verschiedenen Körperflüssigkeiten.....	58
5.2.1. Seminalplasma bei Normozoospermie.....	58
5.2.2. Prä- und postoperatives Seminalplasma bei Vasektomie.....	60
5.2.3. Prostataexprimate bei Normozoospermie.....	62
5.2.4. "Gewaschene" Spermatozoen.....	65
5.2.5. Blutserum.....	67
5.3. Bestimmung der ACE-Aktivität in isolierten Membranvesikeln.....	71
5.4. Gelchromatographische Untersuchungen zur Verteilung der ACE-Aktivität im Seminalplasma.....	74
5.4.1. Gelfiltration von Membranvesikeln.....	74
5.4.1.1. Isolierte Membranvesikel.....	74

5.4.1.2. Gelchromatographie von Membranvesikeln nach Gefrierschockbehandlung.....	77
5.4.1.3. Solubilisierte Membranvesikel.....	80
5.4.2. Gelfiltration von Seminalplasma.....	82
5.4.3. Gelfiltration von Prostataexprimaten.....	85
5.5. Vergleich der Eigenschaften des Angiotensin converting enzyme in Seminalplasma und Blutserum.....	88
5.5.1. Temperaturabhängigkeit der ACE-Aktivität.....	88
5.5.2. Einfluß verschiedener Substratkonzentrationen auf die ACE Aktivität.....	89
5.5.3. Einfluß verschiedener Inhibitoren auf die ACE Aktivität.....	92
5.5.3.1. Bradykinin.....	92
5.5.3.2. Kallidin.....	95
5.5.3.3. Methionylkallidin.....	98
5.5.3.4. Angiotensin I.....	101
5.5.3.5. Angiotensin II.....	101
5.5.3.6. Angiotensin III.....	104
5.5.3.7. D-Phenylalanyl-L-Phenylalanyl-L-Arginin-Chloromethylketon.....	107
5.5.3.8. Bradykinin Potentiator B.....	110
5.5.3.9. Bradykinin Potentiator C.....	113
5.5.3.10. Methionin-Enkephalin.....	116
5.5.3.11. Bestatin.....	119
5.5.3.12. Neurotensin.....	119
5.5.3.13. Zincov ^A	122
6. DISKUSSION.....	124
6.1. Vorversuche.....	126
6.2. Bestimmung der ACE-Aktivität in verschiedenen Körperflüssigkeiten.....	126
6.3. Bedeutung der Membranvesikel für die ACE Aktivität im Seminalplasma.....	127
6.4. Eigenschaften von Angiotensin-converting-enzyme im Seminalplasma und Serum.....	131
6.4.1. Einfluß der Temperatur und Substratkonzentration.....	131
6.4.2. Einfluß des pH-Wertes.....	132

6.4.3. Einfluß verschiedener Inhibitoren.....	132
7. SCHLUSSFÖLGERUNGEN.....	137
8. ZUSAMMENFASSUNG.....	139
9. LITERATURVERZEICHNIS.....	141
10. DANKSAGUNG.....	158
11. LEBENS LAUF.....	159

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

A	=	Absorbance
ACE	=	Angiotensin-converting-enzyme
HHL	=	Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin
k_i	=	Inhibitor-Konstante
KKS	=	Kallikrein-Kinin-System
k_m	=	Michaelis-Konstante
RAS	=	Renin-Angiotensin-System
SP	=	Seminalplasma
U	=	Unit
v_{max}	=	maximale Reaktionsgeschwindigkeit

1. EINLEITUNG

1.1. VORWORT

Wenn in der heutigen Zeit von Familienplanung die Rede ist, meint man dabei fast immer nur die Möglichkeit der Empfängnisverhütung. Mit der Etablierung der hormonellen Kontrazeption hat der modern denkende Mensch das sogenannte Problem der Fortpflanzung in den Griff bekommen. Es sieht daher so aus, daß in unserer heutigen Gesellschaft die Kontrazeption wichtiger als die Konzeption ist. Es gilt jedoch auch den anderen Aspekt der Familienplanung zu betrachten, nämlich den der gewollten und erwünschten Empfängnis vieler kinderloser Ehepaare. Die Zahl der Ehen, die ungewollt kinderlos sind, beträgt etwa ein Zehntel. Dabei liegt die Ursache der Sterilität zu 50 % bei der Frau, zu 30 % beim Mann und zu 20 % bei beiden Ehepartnern (2). Diese Ehepaare tragen oft schwer an ihrem Schicksal. So ist es die ärztliche Pflicht sich dieser Menschen anzunehmen und ihnen durch Beratung und geeignete Behandlung zu helfen, zumal durch die ungewollte Kinderlosigkeit die psychischen und sozialen Auswirkungen für die Betroffenen als auch für die Allgemeinheit unübersehbar sind. Was aber wird und konnte bisher gegen die Sterilität des Mannes getan werden?

1.2. MÄNNLICHE STERILITÄT

Bei einem fertilen Mann werden in den Tubuli seminiferi ca. 125 Millionen Spermatozoen pro Tag gebildet und im Nebenhoden gespeichert (3). Um die Spermatozoen zum richtigen Zeitpunkt des weiblichen Zyklus in der Vagina deponieren zu können, muß eine normale Erektions- und Ejakulationsfähigkeit gewährleistet sein. Während des letzteren Vorgangs kommt es zur Vermischung der Spermatozoen mit den Sekreten der Bläschendrüsen und der Prostata. Die während des Orgasmus noch nicht völlig ausgereiften ejakulierten Spermatozoen machen während ihrer Aszension durch die zervikalen und uterinen Sekrete zur Tube hin Reifungsvorgänge durch, um danach die Befruchtungsfähigkeit zu erlangen.

Ein reibungsloser Ablauf der beschriebenen Mechanismen und die qualitativ wie quantitativ richtige Zusammensetzung des Ejakulats sind unabdingbare Voraussetzungen für die Fertilität des Mannes.

Das normale Ejakulat setzt sich nun wie folgt zusammen:

ABB. 1: ÜBERSICHT DER NORMWERTE DES EJAKULATS NACH SCHIRREN (84):

Menge	2,0 - 6,0 ml
pH	7,0 - 7,8 (Indikatorpapier) 6,6 - 8,0 (Glaselektrode)
Geruch	kastanienblütenartig
Farbe	grau-weiß-gelblich
Konsistenz	zähflüssig/flockig (Verflüssigung in 15 - 30 Min.)
Spermatozoenzahl	über 20 Mill. Sp./ml
Spermatozoenmotilität	
Globalmotilität	über 50 %
sehr lebhaft vorwärts	
beweglich	über 30 %
mäßig beweglich	20 % - 30 %
unbeweglich	30 %
Spermatozoenmorphologie	über 50 %
Spermatozoen-Länge	
Kopf	3,0 - 5,0 μ
Mittelteil	5,0 - 7,0 μ
Schwanz	45 μ
Spermatozoen-Breite	
Kopf	2,0 - 3,0 μ
Mittelteil	1,0 μ
Fructose	über 1200 μ g/ml
Akrosin-Aktivität	50 - 200 mU/ml
Trypsininhibitor-Aktivität	100 - 350 mU/ml
Carnitin	7,0 mg%
Phosphatase (sauer)	100 - 300 μ g P_2O_5 /30 Min.
Zitronensäure	300 mg%
Inosit	1000 - 2500 μ g/ml
Natrium	265 mg%

ABB. 1: FORTSETZUNG:

Kalium	54,2 mg%
Kalzium	26,6 mg%
Zink	470 µg/ml
Spermin	254 - 3180 γ/ml
Spermidin	30 - 366 γ/ml
Phosphohexose-Isomerase	35,6 - 2650 µMol
	Fructose-6-phosphat/ml/h
Nucleinsäure	2,18 - 2,60 x 10 ⁻¹⁵ g

Dabei macht das Seminalplasma ca. 95 % des Gesamtejakulatvolumens aus. Die Sekrete der Prostata sind daran bis zu 30 % und die Sekrete der Bläschendrüsen, des Nebenhodens, des Ductus deferens und der Cowperschen Drüsen bis zu 40 % beteiligt. Das Seminalplasma ermöglicht als physiologisches Medium den ejakulierten Spermatozoen die Migration im weiblichen Genitaltrakt. Es stellt die Energiequelle für die Ernährung der Spermatozoen und enthält Faktoren als Schutz gegen das saure Vaginalmilieu.

Motilität und Vitalität der Spermatozoen sind abhängig von einem optimalen Verhältnis zwischen den Sekreten der Prostata und der Bläschendrüsen. Prostatasekret übt einen stimulierenden Einfluß auf die Spermatozoenmotilität aus, wogegen das Sekret der Bläschendrüsen eher hemmend wirkt (22). Die biochemische Zusammensetzung des Prostatasekrets ist bis jetzt jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt worden. Die Zusammensetzung des Seminalplasmas ist unabhängig von der Frequenz der Ejakulationen (21).

Da im Gegensatz zu den weiblichen Fertilitätsstörungen, die Kenntnisse der funktionellen Zusammenhänge und deshalb auch die Behandlungsmöglichkeiten bei männlichen Fertilitätsstörungen sehr gering sind, ist man hier häufig noch auf symptomatische Behandlungsmethoden angewiesen.

Zu erwähnen ist an dieser Stelle auch die Wichtigkeit einer intensiven Beratung der Ehepartner zur Verbesserung ihrer sexuellen Beziehungen bzw. der psychologischen Einstellung zum Problem der Sterilität, als Voraussetzung einer erfolgreichen Therapie.

1.3. ZIELSETZUNG DER UNTERSUCHUNGEN

Die Kenntnisse über die Zusammensetzung des Seminalplasmas sowie über seine funktionelle Bedeutung sind heute noch gering.

Bemerkenswert ist allerdings, daß es eine ganze Reihe von biologisch bedeutsamen Komponenten gibt, die im Seminalplasma in signifikant höheren Konzentrationen vorkommen als in anderen Körperflüssigkeiten. Zu den im Seminalplasma in höheren Aktivitäten nachweisbaren funktionellen und physiologisch äußerst bedeutsamen Makromolekülen gehört auch das Angiotensin-converting-enzyme (E.C.3.4.15.1.):

- ACE-Aktivität im Seminalplasma: $2,6 \pm 0,8 \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$ (82)
- ACE-Aktivität im Serum: $0,02 - 0,07 \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$ (82)

ACE gehört sowohl zum Renin-Angiotensin-System als auch zum Kallikrein-Kinin-System.

Über die physiologische und pathophysiologische Bedeutung des RAS und KKS im Hinblick auf die Fertilitätsstörungen des Mannes ist jedoch nur sehr wenig bekannt. Da ACE sehr wahrscheinlich ein regulatorisches Schlüsselenzym zwischen den beiden Systemen darstellt (65), konzentrierten sich darauf die meisten Untersuchungen.

Hierbei ergaben sich zwei besonders wichtige Aspekte:

- Die genaue Charakterisierung des ACE im Seminalplasma:
Hier sollte Näheres über die Eigenschaften des ACE und seinen Syntheseort im männlichen Genitaltrakt erfahren werden, mit dem Ziel sein regulatorische Bedeutung zu verstehen.

- Nach der Reindarstellung des ACE eine vergleichende Charakterisierung der katalytischen Eigenschaften des ACE im Serum und Seminalplasma:

Dafür wurden von uns spezifische Inhibitoren des ACE und auch andere Peptidase-Inhibitoren verwendet.

2. B I S H E R I G E F O R S C H U N G S E R G E B N I S S E

2.1. GESCHICHTLICHER RÜCKBLICK

2.1.1. DAS RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEM

Bereits aus dem Jahre 1898 stammen die Ergebnisse der ersten Untersuchungen auf diesem überaus wichtigen und interessanten Gebiet des menschlichen Stoffwechsels. Tigerstedt und Bergman entdeckten, daß intravenös injiziertes Nierengewebe blutdrucksteigernd wirkt. Sie nannten die aktive Komponente "Renin" (105).

Munoz et al. fanden 1939 heraus, daß Renin ein Enzym ist, welches das unwirksame Protein Hypertensinogen (=Angiotensinogen) in das biologisch aktive Hypertensin (=Angiotensin I) umwandelt (62).

Im Jahre 1954 wurde erstmals ein Enzym beschrieben, welches Angiotensin I weiter umwandelt. Skeggs et al. entdeckten, daß durch dieses Enzym in Anwesenheit von Halogen- und Nitrationen aus Angiotensin I Angiotensin II gebildet wird (89). Dieses Enzym wurde später Angiotensin-converting-enzyme (E.C.3.4.15.1) genannt. Skeggs und seine Mitarbeiter ermittelten auch die Aminosäuresequenz des Dekapeptids Angiotensin I. Durch Abspaltung von His-Leu vom COOH-terminalen Ende entsteht aus dem Dekapeptid Angiotensin I das stark vasokonstriktorisch wirkende Oktapeptid Angiotensin II (90,91)(Abb. 2).

In der folgenden Zeit wurde das Vorkommen von ACE in den verschiedenen Körpergeweben untersucht. Man entdeckte die Lunge als Schlüsselregion für die Entstehung des Angiotensin II. Ryan et al. erkannten, daß ACE eine Komponente der vaskulären Endotheloberflächen der Lunge darstellt (78).

ABB. 2: DAS RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEM NACH SKEGGS ET AL. (92):

Tetradeka-peptid Renin Substrat

Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-Ser-R,

(Renin-Substrat, Angiotensinogen)



Renin (E.C.3.4.99.19)

Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu + Leu-Val-Tyr-Ser-R

(Angiotensin I)



Angiotensin-converting-enzyme

Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe + His-Leu

(Angiotensin II)

2.1.2. DAS KALLIKREIN-KININ-SYSTEM

Das Kallikrein (E.C.3.4.21.8), das wichtigste Enzym des KKS, wurde in den Jahren 1925 bis 1928 von E.K. Frey, einem Münchner Chirurgen, und H. Kraut entdeckt (29). Seine blutdrucksenkenden, gefäßerweiternden und durchblutungsfördernden Eigenschaften waren schon damals aufgefallen. Kallikrein wurde aus der Bauchspeicheldrüse extrahiert und gereinigt und kam schon 1930 als Pharmakon unter der Bezeichnung Padutin^R in den Handel.

Anfang der 30er Jahre beobachtete Werle, daß ein aus Pankreasgewebe isoliertes Präkallikrein durch Trypsinbehandlung in Kallikrein übergeführt werden kann. Durch das aktivierte Kallikrein kann unter Verwendung von Serum als Substrat eine vasoaktive Substanz gebildet werden (110).

1961 bewiesen Werle et al. durch die Isolierung des Oligopeptids Kallidin, daß Kallikrein das Enzym ist, welches vasoaktives

gereinigtes Kallikrein-Präparat auf den Markt brachte, begannen nun viele Forschungsteams die Wirkungen der Kallikreine auf die verschiedenen Körperfunktionen zu untersuchen.

2.1.3. ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DEM RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEM UND DEM KALLIKREIN-KININ-SYSTEM

1965 entdeckte Ferreira, daß durch eine Mischung von Peptiden aus dem Schlangengift der Viper *Bothrops jaracca* sich die Wirksamkeit des von Rocha e Silva entdeckten Bradykinins erhöht und sich die Aktivität der Bradykininase vermindert bzw. gehemmt wird (26).

Bakhle fand nun heraus, daß diese Peptide sowohl den Abbau des Bradykinins als auch die Aktivität des ACE inhibieren. Weitere Forschungen in dieser Richtung lieferten den Beweis, daß Bradykininase (Kininase) und ACE identische Enzyme sind. Somit ist dem ACE eine Schlüsselfunktion im RAS sowie im KKS zuzuordnen.

2.2. BEDEUTUNG DES ANGIOTENSIN-CONVERTING-ENZYME ALS BINDEGLIED ZWISCHEN DEM RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEM UND DEM KALLIKREIN-KININ-SYSTEM

2.2.1. REAKTIONSMECHANISMEN

Kallikreine sind Kininogenasen, d.h. sie setzen aus den im Serum und in den Geweben vorkommenden Kininogenen Kinine frei. Wie bereits unter 2.1.2. erwähnt unterscheidet man Gewebeskallikreine und Plasmakallikreine (Abb. 4).

Das Gewebeskallikrein besteht aus einer A-Kette mit 80 Aminosäuren und einer B-Kette mit 152 Aminosäuren (106) (Abb. 5).

Durch Hydrolyse des inaktiven Pro-Enzyms Präkallikrein entsteht Kallikrein. Dabei läuft die Spaltung des Präkallikreins in Gewebe und Plasma unterschiedlich ab (Abb. 6).

ABB. 4: EIGENSCHAFTEN DER GEWEBS- UND PLASMAKALLIKREINE:

	Gewebskallikrein	Plasmakallikrein
Molekulargewicht	27000 - 35000	100000
Vorkommen	Pankreas, Darm, Speicheldrüsen, Niere	Serum
Substrat	LMW-Kininogene (light-molecular- weight), MG 50000	HMW-Kininogene (heavy-molecular- weight), MG 75000
Produkt	Kallidin	Bradykinin

ABB. 5: AMINOSÄURESEQUENZEN VON KININOGEN UND KALLIDIN:

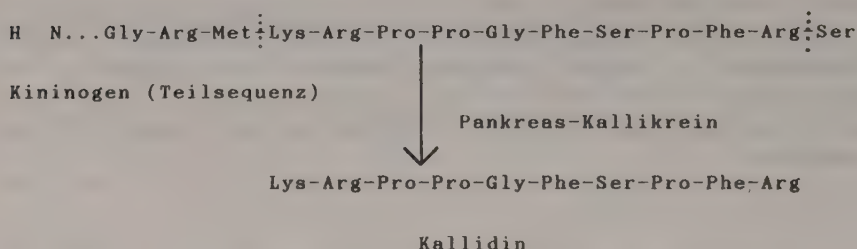


ABB. 6: BEDINGUNGEN DER HYDROLYSE DES PRÄKALLIKREINS ZU KALLIKREIN:

	Anwesenheit erforderlich von
Gewebe	Trypsin
Plasma	Faktor XII (Hageman-Faktor)

Der Faktor XII wird aktiviert durch Präkallikrein und Kininogene. Er wird inaktiviert durch Kininabbauprodukte, die aus histidinreichen Polypeptiden bestehen.

Die eigentlichen Effektoren des KKS stellen die Kinine dar. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind Bradykinin, Kallidin und Methionylkallidin. Es sind biologisch hochwirksame Peptide mit einer Halbwertszeit von nur 45 Sekunden im Blutplasma.

Ihre Eigenschaften und Wirkungen wurden mit Hilfe des Pharmakons Padutin^R indirekt erforscht. Durch Freisetzung von Prostaglandinen bewirken sie in der Haut (111), im Muskel (31), im Gehirn (25) und im Mesenterium (60) eine Vasodilatation sowie eine Beschleunigung des Blutstroms (64). Des Weiteren fördern Kinine die Glucoseabsorption (58).

Ebenso fördern Kallikreine die Absorption von Aminosäuren, Nukleotiden (71), Wasser und Elektrolyten (17). Außerdem konnte nach Kallikreingaben eine Steigerung der Zellproliferation beobachtet werden (72).

Im Stoffwechsel spielt das ACE, daß man auch Kininase II nennt, eine wichtige Schlüsselfunktion. Wahrscheinlich ist es der wichtigste physiologische Regulator des KKS und RAS.

ACE ist eine Dipeptidylcarboxypeptidase. Seine beiden physiologischen Substrate sind das Angiotensin I und das Bradykinin. Beide Peptide sind an der Regulation des Blutflusses beteiligt.

Durch ACE wird bei Angiotensin I am C-terminalen Ende das Dipeptid His-Leu abgespalten und aus dem Dekapeptid Angiotensin I entsteht das vasokonstriktorisch wirkende Oktapeptid Angiotensin II (siehe Abb. 2).

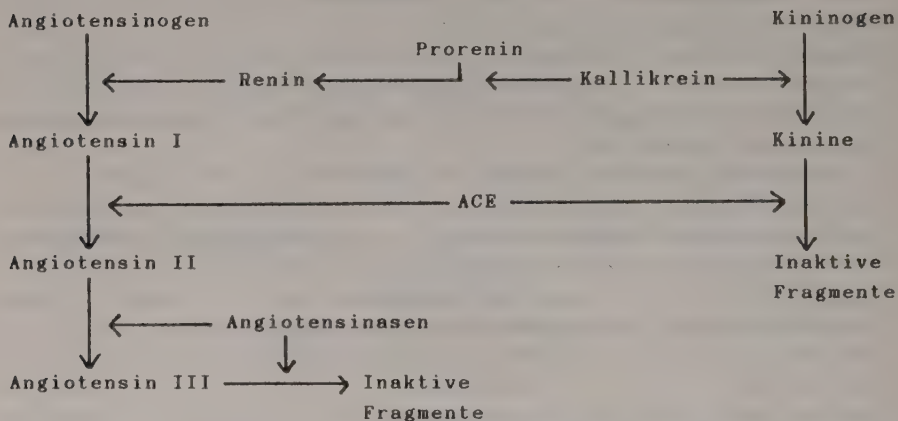
Als zweites Substrat wird von ACE Bradykinin gespalten. Vom COOH-terminalen Ende wird das Dipeptid Phe-Arg abgespalten und Bradykinin dadurch inaktiviert.

Eine weitere Verknüpfung dieser beiden Systeme läuft über Kallikrein, das aus inaktivem Prorenin Renin freisetzt (42,65). Dieser Umwandlungsprozeß findet u.a. in den Nieren statt. Renin bewirkt nun, daß aus der inaktiven Vorstufe Angiotensinogen das aktive Dekapeptid Angiotensin I entsteht (siehe Abb. 2, Abb. 7). Angiotensin I kann auch durch Angiotensinase A in des-Asp-Angiotensin I übergeführt werden, das durch ACE in Angiotensin III umgewandelt wird. Angiotensin III kann auch direkt aus Angiotensin II entstehen. Es regt die Steroidbildung in der

Nebennierenrinde an und seine Hemmung führt zur Blockade des RAS sowie zu Blutdruckabfall (12).

Diese wechselseitigen Beziehungen des ACE zwischen den beiden Systemen sind in Abb. 7 dargestellt.

ABB. 7: DAS RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEM UND KALLIKREIN-KININ-SYSTEM NACH ONDETTI UND CUSHMAN (65):



ACE verändert auch die β -Kette des Insulins (9).

Bei den Mammaliern ist das ACE als spezifische Komponente der Endothelzellen (11) und des Parenchyms der Niere (95) nachweisbar. Es besteht wahrscheinlich aus einer einzigen Polypeptidkette mit zahlreichen Oligosaccharidsequenzen. Es ist ein Metalloprotein, das Zink kovalent äquimolar gebunden enthält und für die Aktivität benötigt. Zink kann durch andere Schwermetalle, wie z.B. Kobalt ersetzt werden. Dadurch ändert sich auch die Substratspezifität.

Die höchsten Aktivitäten des ACE findet man beim Menschen in Hoden- und Nebenhodengeweben, sowie insbesondere in der Prostata. Außerdem finden sich noch relativ hohe Werte in der Lunge, während sich die Aktivitäten im Blutserum bei verschiedenen Erkrankungen unterschiedlich verhalten (85).

- Erhöhte ACE-Aktivität im Serum:

Vorkommen bei Lungensarkoidose, Lepra, Morbus Gaucher, akuter Virushepatitis und Lebercirrhose (85)

- Erniedrigte ACE-Aktivität im Serum:

Vorkommen bei Lungenfibrose, Lungenkarzinom, Lungentuberkulose und der Schocklunge (85)

Hypertoniker können mit spezifischen ACE-Inhibitoren, nämlich Captopril (Lopirin^R) oder Enalapril (Pres^R) therapiert werden.

2.2.2. DAS ANGIOTENSIN-CONVERTING-ENZYME - REGULATOR DES GLEICHGEWICHTS

Wie bereits erwähnt besitzt das ACE eine regulatorische Schlüsselfunktion zwischen dem Kallikrein-Kinin-System und dem Renin-Angiotensin-System.

- Einfluß auf das Kallikrein-Kinin-System:

ACE inhibiert Kinine. Dies hat einen Blutdruckanstieg zur Folge, da die vasodilatatorischen Eigenschaften der Kinine dadurch wegfallen.

Die Glucoseabsorption wird verschlechtert.

Da die Abbauprodukte der Kinine den Faktor XII des Gerinnungssystems hemmen, greift ACE auch indirekt in das Gerinnungs- und Lysis-System ein. Dieser Faktor XII wird

andererseits jedoch auch für die Aktivierung des Plasmakallikreins benötigt. Durch seine Hemmung wird die Bildung von Plasmakallikrein verhindert (vgl. Abb. 6). Die Abbauprodukte der Kinine üben eine negative Rückkopplung auf das ACE aus. Diese negative Rückkopplung sowie die Hemmung des Plasmakallikreins wirken sich nun indirekt auf das Renin-Angiotensin-System aus.

- Einfluß auf das Renin-Angiotensin-System:

ACE ist hier für die Bildung des Angiotensin II verantwortlich, welches als stärkster Vasokonstriktor angesehen wird. Die Folge ist ein Blutdruckanstieg.

Die Bildung von Angiotensin II und III führt zu einer Zunahme der Steroide in der Nebenniere, im speziellen von Aldosteron, was sich direkt positiv auf die Natriumrückresorption im distalen Tubulus der Niere auswirkt. Dies führt zu einer verminderten Salz- und Wasserausscheidung.

Angiotensin II hat noch einen positiven Einfluß auf das "Durstzentrum".

Die Hemmung des Plasmakallikreins wirkt sich hier auch indirekt aus, indem dadurch die Reninproduktion nicht initiiert wird, was wiederum auf das ganze RAS zurückwirkt.

Erwähnt sei an dieser Stelle auch der hemmende Einfluß des Insulins auf ACE. Ein hemmender Effekt von insulinähnlichen Peptiden muß ebenfalls diskutiert werden.

Abb. 8 zeigt die regulatorische Abhängigkeit des Kallikrein-Kinin-Systems und Renin-Angiotensin-Systems im Zusammenhang.

LEGENDE ZU ABB. 8:

HRP = Histidinreiche Polypeptide

PA = Proaktivator

PG = Prostaglandin

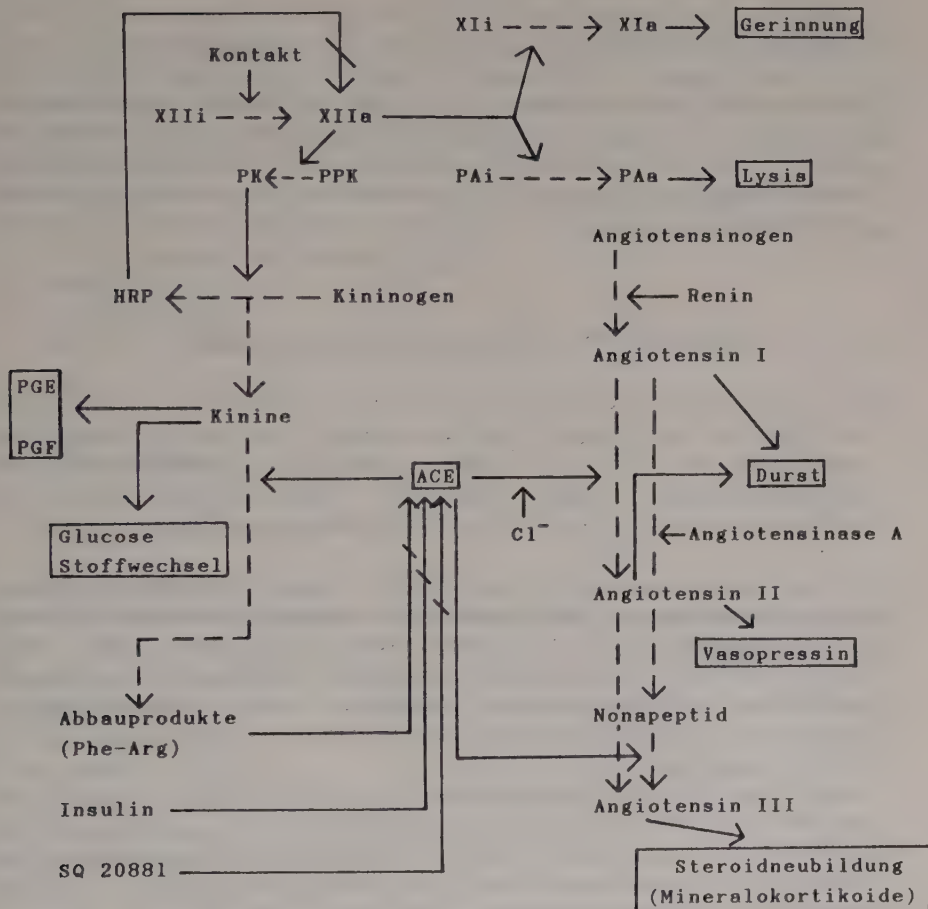
PK = Plasmakallikrein

PPK = Plasmapräkallikrein

SQ 20881 = Inhibitor des ACE

-----> Umwandlung
 =====> fördernd
 ———> hemmend

ABB. 8: DAS KALLIKREIN-KININ-SYSTEM UND RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEM
NACH G. L. HABERLAND:



2.3. DAS KALLIKREIN-KININ-SYSTEM UND RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEM UND DIE MENSCHLICHE FORTPFLANZUNG

2.3.1. DAS KALLIKREIN-KININ-SYSTEM

2.3.1.1. BEDEUTUNG BEI DER FRAU

Verschiedenen Beobachtungen zufolge ist das KKS am Geburtsprozeß beteiligt (86). Die Anwesenheit von Kininen erhöht den Tonus der glatten Muskulatur des Uterus (24, 111). Im Tierversuch wurde nachgewiesen, daß durch Kallikreingaben die Geburt verzögert werden kann (86).

2.3.1.2. BEDEUTUNG FÜR DIE INFERTILITÄT DES MANNES

Die dominierenden Symptome der idiopathisch bedingten Infertilität des Mannes sind die gestörte Spermatozoenmotilität (Asthenozoospermie) und die reduzierte Spermatozoenzahl (Oligozoospermie), wobei man von Oligozoospermie bei einer Spermatozoenzahl von weniger als 20 Mill./ml spricht.

Stüttgen hat als erster über Beobachtungen berichtet, wonach durch Behandlung mit Depot-Padutin (= Schweinepankreas-kallikrein) die Spermatozoenzahl jener Patienten ansteigt (104). Man führt dies auf eine direkte Wirkung des Kallikreins auf die Sertoli-Zellen des Hodens zurück, bei denen eine Vergrößerung zu beobachten war (73). Daneben ist auch eine direkte Enzymwirkung auf die Gonozyten denkbar (74).

Schill und Haberland untersuchten den Einfluß des Kallikreins auf die Motilität der Spermatozoen. Sie stellten eine qualitative wie quantitative Motilitätsstimulation fest (79), deren Ursache in Permeabilitätsänderungen der Spermatozoenzellmembranen oder in einem direkten Kinineinfluß auf die Transportprozesse zu suchen ist.

Wallner et al. demonstrierten den Zusammenhang zwischen der Motilität der Spermatozoen und der Zervixmukuspenetration (10).

Schill hat neben einer Reihe anderer Pharmaka auch die Verwendung von Kallikrein zur Therapie männlicher Fertilitätsstörungen diskutiert (81).

So zeigte sich nach Applikation von täglich 600 KE Padutin^R 100 über sieben Wochen bei Patienten mit Asthenozoospermie eine Motilitätszunahme (49). Bei Patienten mit Oligozoospermie war nach intramuskulärer Verabreichung von 40 KE Padutin^R 100 ebenfalls eine Motilitätssteigerung sowie eine Zunahme der Spermatozoenzahl zu beobachten (80). Aus beiden Behandlungsschemata resultierte eine Konzeptionszunahme.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Indikation einer Kallikreinbehandlung gegeben ist bei

- Asthenozoospermie
- Oligozoospermie
- Teratozoospermie.

2.3.2. DAS RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEM

2.3.2.1. BEDEUTUNG BEI DER FRAU

Hohe Reninaktivitäten können im Uterusgewebe und in der Amnionflüssigkeit nachgewiesen werden (93). Der Uterus besitzt eine Angiotensin II - Sensitivität, reagiert dagegen nicht auf Angiotensin I.

Verschiedene Autoren schreiben dem RAS auch eine Rolle beim sexuellen Zyklus und der Schwangerschaftstoxikose zu (27, 28, 104, 108).

2.3.2.2. BEDEUTUNG BEIM MANN

Beim Mann sind bisher noch kaum Untersuchungen angestellt worden. Kaneko konnte zeigen, daß Angiotensin I bei 22⁰ C einen stimulierenden Effekt auf die Geschwindigkeit gewaschener Spermatozoen in Konzentrationen von 1 und 10 ng/ml hat, die Gesamtmotilität aber nicht beeinflusst (43). Bei einer Konzentration von 1000 ng/ml wirkt Angiotensin I

motilitätshemmend. Mizutani und Schill zeigten, daß sowohl Angiotensin I als auch Angiotensin II zu einer Zunahme der Spermatozoengeschwindigkeit bei 37⁰ C in Konzentrationen von 7,7 und 9,6 nMol/l führten (59). Die Spermatozoenmotilität wurde dabei nicht beeinflusst. Angiotensin III beeinflusste weder bei 22⁰ C noch bei 37⁰ C die Spermatozoengeschwindigkeit und Spermatozoenmotilität (59).

Genauere Kenntnisse über die molekulare Wirkungsweise sind bisher jedoch kaum vorhanden, so daß wie bereits unter 1.3. erwähnt, an dieser Stelle mit der Forschung angesetzt werden muß. Auffällig ist jedoch, daß bestimmte Enzyme, wie z.B. Renin (13) und ACE (38) sehr hohe Aktivitäten im Seminalplasma aufweisen.

3. BESTIMMUNGSMETHODEN FÜR ANGIOTENSIN-CONVERTING-ENZYME

In den letzten Jahren sind viele Nachweismethoden zur Bestimmung der ACE-Aktivität entwickelt worden. So stehen uns heute biologische, radiochemische, photometrische und immunologische Methoden zur Verfügung. Dabei mißt man bei allen Nachweisverfahren außer bei den immunologischen Methoden die enzymatische Aktivität des ACE.

3.1. RADIOCHEMISCHE METHODEN

Bei der radiochemischen Bestimmung werden Bradykinin und Angiotensin I radioaktiv markiert. Bradykinin wird in das Substrat 8-(Phe-³H)-Bradykinin umgewandelt, von dem (Phe-³H)-Arg abgespalten wird, dessen Aktivität im β -Counter gemessen wird (77).

Angiotensin I wird mit 125-Jod markiert und durch ACE in 125-Jod-Angiotensin II umgewandelt. Substrat und Produkt werden nun elektrophoretisch aufgetrennt und die Aktivität anschließend in einem γ -Counter gemessen (67).

Eine weitere Methode ist die Verwendung von (³H)-Hip-Gly-Gly als Substrat. Hierbei wird die abgetrennte Hippursäure (³H)-Hip durch Ethylacetat aus dem Reaktionsgemisch extrahiert und die CPM (counts per minute) in einem β -Counter gemessen.

Dieser Test wird von der Fa. Paesel GmbH & Co. als PAESEL/VENTREX ACE - Testsatz vertrieben. Der Anwendungsbereich dieses Tests ist von verschiedenen Autoren diskutiert worden (54, 67, 87).

3.2. PHOTOMETRISCHE METHODEN

Bei den photometrischen Methoden werden als Substrate Oligopeptid-Analoga verwendet, die durch die ACE-Aktivität meist in ein Dipeptid und einen aromatischen Rest gespalten werden. Es gibt Nachweismethoden, bei denen nicht das abgespaltene Dipeptid, sondern ein kovalent gebundener Rest (z.B. Hippursäure oder ein anderer Rest) als Parameter für die Bestimmung der ACE-Aktivität verwendet wird.

Piquillourd et al. entwickelten eine Methode, bei der ACE vom synthetischen Substrat Benzyloxycarbonyl-Phe-His-Leu das Dipeptid His-Leu abspaltet. Dieses Dipeptid reagiert mit Orthophthaldialdehyd und wird fluorimetrisch gemessen (69).

Weitere Substrate für photometrische Nachweismethoden sind tert-Butyloxycarbonyl-Phe(NO₂)-Phe-Gly, Benzyloxycarbonyl-Phe(NO₂)-His-Leu, Benzyloxycarbonyl-Phe(NO₂)-Gly-Gly und Hip(NO₂)-Gly-Gly (69). Die Rate der Hydrolyse wird hierbei aus der Differenz der Extinktionen von Substrat und der entstehenden Produkte bestimmt (100).

Eine Bestimmung der ACE-Aktivität mit dem Substrat Hip-Gly-Gly ist ebenfalls möglich. Gly-Gly wird hierbei abgespalten. Dieses Dipeptid kann mit Ninhydrin umgesetzt und spektralphotometrisch gemessen werden (114).

Die wohl verbreitetste Nachweismethode ist die von Cushman und Cheung beschriebene (14). Dabei wird das Substrat Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin verwendet. ACE spaltet dieses synthetische Substrat in L-His-L-Leu und Hippursäure. Die freiwerdende Hippursäure wird mit Ethylacetat aus dem Reaktionsgemisch extrahiert und ihre Konzentration spektralphotometrisch bei 228 nm bestimmt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß weder das Substrat noch andere Verunreinigungen, wie z.B. Nukleotide, bei 228 nm die spektralphotometrische Messung der abgespaltenen Hippursäure beeinträchtigen (14).

3.3. IMMUNOLOGISCHE METHODEN

Der immunologische Nachweis von ACE ist neuerdings ebenfalls möglich (88). Dazu müssen allerdings zuerst Antikörper gegen ACE hergestellt werden. Voraussetzung hierfür ist jedoch das Vorliegen von reinem ACE. Die Aussagekraft dieser Methode ist jedoch beschränkt, da nicht zwischen aktivem und inaktivem ACE unterschieden werden kann. Von Wert wäre diese Methode allerdings für die Erkennung von Isoenzymen.

4. MATERIALIEN UND METHODEN

4.1. VERWENDETE SUBSTANZEN

Folgende Substanzen wurden für die Untersuchungen verwendet:

Fa. Bachem Feinchemikalien AG, Bubendorf, Schweiz:

- N- α -Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin x 4 H₂O
- Angiotensin I, II und III
- L-Lys-Bradykinin x 3 AcOH (Kallidin)
- L-Met-L-Lys-L-Bradykinin x 3 acetat

Fa. Serva Feinbiochemika, Heidelberg:

- Pyr-Gly-Leu-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro-Ile-Pro-Pro x 3 H₂O
(Bradykinin-Potentiator C)
- Pyr-Gly-Leu-Pro-Pro-Arg-Pro-Lys-Ile-Pro-Pro x acetat
(Bradykinin-Potentiator B)
- Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg x triacetat
(Bradykinin x triacetat)
- Cholsäure - Na-salz 1% w/v (C₂₄H₃₉O₅ x Na)

Fa. Sigma Chemical Company, St. Louis, USA:

- Bestatin Hydrochlorid
- Neurotensin (pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu x 3 AcOH)
- Methionin Enkephalin
(L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-Ala-L-Met x AcOH)

Fa. Calbiochem - Behring Corporation, La Jolla, USA:

- D-Phenylalanyl-L-Phenylalanyl-L-Arginin - Chloromethylketon,
(Dihydrochlorid, lyophilisiert)
- Zincov^R
(2-(N-Hydroxy-carboxamido)-4-methylpentanoyl-L-alanyl-glycin
amid)
- Metalloproteasen - Inhibitor

Fa. Pharmacia Fine Chemicals:

- Sepharose 6B (Gelbettvolumen 1,5 cm x 47 cm)

Die Ejakulate stammten von Patienten der Andrologischen Ambulanz der Dermatologischen Universitätsklinik München. Die sexuelle Karenzzeit betrug 5 Tage. Die Ejakulatgewinnung erfolgte durch Masturbation.

Die Prostataexprimate stammten von Patienten der Urologischen Abteilung der Landeskrankenanstalten Salzburg/Österreich. Die Gewinnung erfolgte durch rektale Massage.

Die Blutseren stammten von Patienten der Dermatologischen Universitätsklinik München.

4.2. BESTIMMUNG DES ANGIOTENSIN-CONVERTING-ENZYME NACH CUSHMAN UND CHEUNG

Für diesen Test wurde das synthetische Substrat Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin (HHL) verwendet (14). Die Methode wurde durch den Zusatz von 2,5 Vol% n-Butanol modifiziert (1).

4.2.1. HERSTELLUNG DES SUBSTRATS

Nach Cushman und Cheung erweist sich dieser Test am empfindlichsten bei einem pH zwischen 8,1 und 8,3, einer 300 millimolaren Chloridionenkonzentration und einer HHL-Konzentration zwischen 5 und 10 mM (Abb. 9, 10)(14).

ABB. 9: EFFEKT DES PH AUF DIE AKTIVITÄT DES ACE NACH CUSHMAN ET AL. (14):

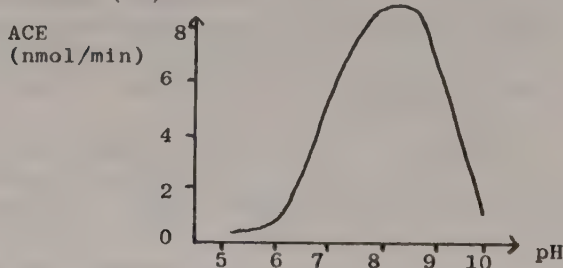
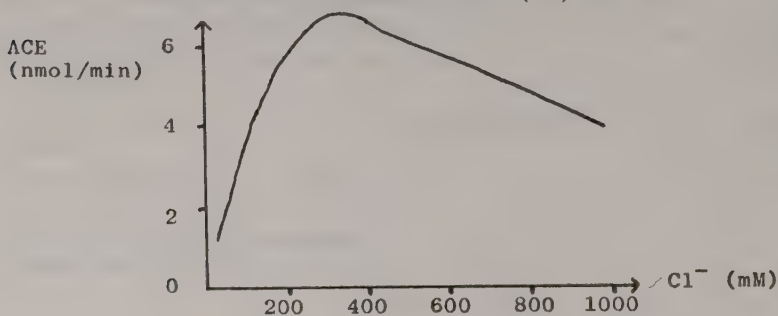
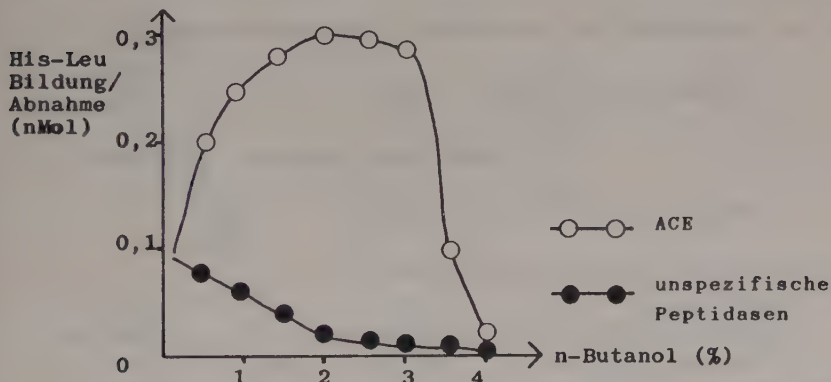


ABB. 10: EFFEKT DER CHLORIDIONENKONZENTRATION AUF DIE AKTIVITÄT DES ACE NACH CUSHMAN ET AL. (14):



Dem somit verwendeten Substratpuffer (0,1 M K_2HPO_4 , 0,3 M NaCl, 5 mM HHL, pH 8,3) wurden 2,5 Vol% n-Butanol (Merck, reinst) zugesetzt. Dadurch wurden unspezifische das Substrat spaltende Peptidasen selektiv gehemmt und gleichzeitig die ACE-Sensibilität erhöht (Abb. 11)(1).

ABB. 11: EFFEKT VON N-BUTANOL AUF DIE ACE-AKTIVITÄT (1):



4.2.2. AUFBEREITUNG DES BIOLOGISCHEN MATERIALS

Die Aktivität des ACE wurde in verschiedenen biologischen Materialien, die den unterschiedlichsten Aufbereitungsverfahren unterlagen, bestimmt.

Folgende Materialien wurden verwendet:

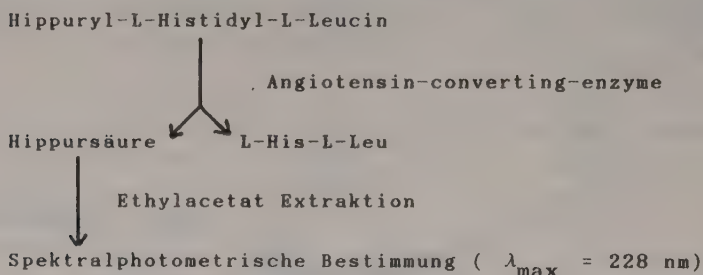
- Seminalplasma
- Prostataexprimat
- Membranvesikel (isoliert aus menschlichem Seminalplasma)
- Spermatozoen
- Blutserum

Näheres über die Aufbereitungsmethoden findet sich in den entsprechenden Abschnitten.

4.2.3. BESTIMMUNG DER ENZYMATISCHEN AKTIVITÄT VON ACE

Das Prinzip dieser Nachweismethode beruht auf der Spaltung des Substrats HHL in L-His-L-Leu und Hippursäure durch das Enzym ACE. Die freiwerdende Hippursäure wird mit Ethylacetat extrahiert und ihre Konzentration spektralphotometrisch bei 228 nm bestimmt (Abb. 12).

ABB. 12: BESTIMMUNG VON ANGIOTENSIN-CONVERTING-ENZYME:



Ansatz: 240 µl Substratpuffer (0,1 M K_2HPO_4 , 0,3 M NaCl, 5 mM HHL, pH 8,3)

+ 10 µl ACE enthaltende Probe

30 min Inkubation bei 37° C

+ 250 μ l HCl (1 N)

+ 1.5 ml AcOH

Zentrifugation (800 x g, 5 min, 22° C)

Abpipettieren von 1 ml der organischen Phase

AcOH - Entfernung im Stickstoffstrom

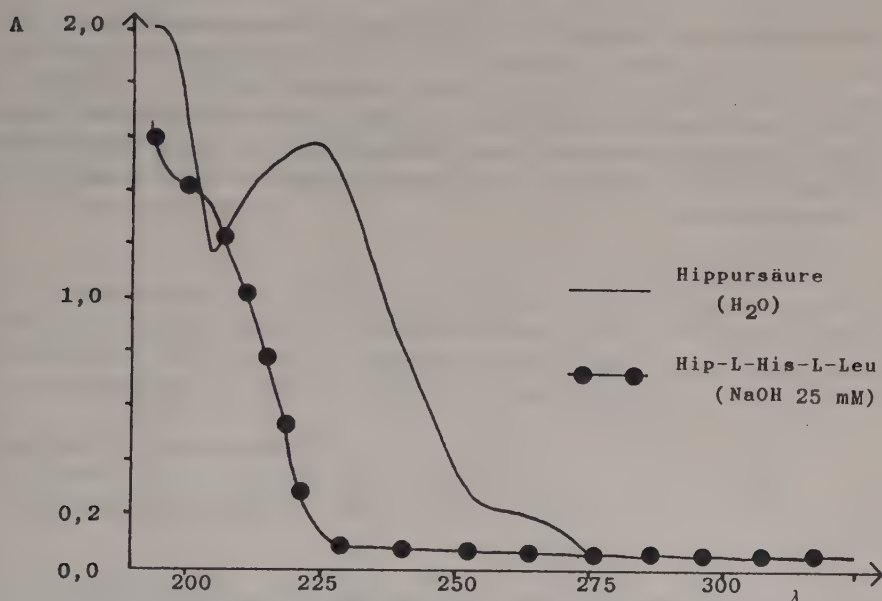
Rückstand in 1 ml Aqua dest. aufnehmen

Photometrische Bestimmung bei 228 nm

Als Leerwert wurden 250 μ l Substratpuffer verwendet.

Eigene Untersuchungen sowie Literaturangaben (14) zeigen, daß bei einer Wellenlänge von 228 nm die Nachweisempfindlichkeit für Hippursäure am größten ist. Die Extinktion für Hip-L-His-L-Leu ist hierbei minimal ($< 0,1 \times \text{cm}^{-1}$) (Abb. 13).

ABB. 13: ABSORPTIONSSPEKTREN VON HIPPURSÄURE UND HIP-L-HIS-L-LEU:



4.2.4. AUSWERTUNG DES TESTS

Als 1 Unit ACE wurde diejenige Aktivität definiert, die in 1 Minute 1 μmol Hippursäure aus HHL bei 37° C unter Standardbedingungen freisetzt.

Zur Berechnung wurde die von Cushman und Cheung angegebene Formel verwendet (14):

$$A(\text{Probe}) - A(\text{Leerwert}) \times 5,6 \times 10^{-3} = \text{ACE-Aktivität} \\ (\mu\text{mol/ml} \times \text{min})$$

Bei den Versuchen, bei denen Verdünnungen erforderlich waren, mußte noch jeweils der entsprechende Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden. Die Verdünnung erfolgte jeweils mit Substratpuffer.

4.3. CHARAKTERISIERUNG DER BESTIMMUNGSMETHODE VON CUSHMAN ET AL.

Die Charakterisierung erfolgte nach folgenden Kriterien:

- Linearität
- Reproduzierbarkeit
- Interassay-Genauigkeit

Als Testsubstanz wurde humanes Seminalplasma verwendet. Die Ejakulate wurden hierfür nach Verflüssigung (nach ca. 2 Stunden) 3 Minuten mit der Eppendorf Zentrifuge (Typ 5414, 16000 x g, 22^o C) zentrifugiert. Unter diesen Bedingungen war eine Sedimentation der Membranvesikel noch nicht zu erwarten. Der Überstand stellte Seminalplasma dar und wurde bei -20^o C in Portionen aufbewahrt.

Die Überprüfung der Linearität erfolgte zwischen verschiedenen ACE-Aktivitäten und der Konzentration des umgesetzten HHL-Substrates. Dazu wurden Verdünnungsreihen mit unterschiedlichen Seminalplasmen (n = 5) und Puffer hergestellt.

Verwendete Verdünnungen:

1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:10; 1:16; 1:20

(Seminalplasma:Gesamtvolumen)

Zur Überprüfung der Linearität wurden 15 Testansätze eines 1:10 verdünnten Seminalplasmas hergestellt und darin die ACE-Aktivität unter gleichen Testbedingungen bestimmt.

Des weiteren wurde die Interassay-Genauigkeit überprüft. Hierzu erfolgte die erste Messung der ACE-Aktivität am 22.11.83 bei 10 verschiedenen Seminalplasmen (Verdünnung 1:10). Die Lagerung der Seminalplasmen erfolgte bei -20^o C ohne Zusätze. Am 22.05.84 wurde die Messung unter identischen Bedingungen wiederholt.

Die Versuchsdurchführungen erfolgten wie unter 4.2.3 beschrieben.

4.4. QUANTITATIVE BESTIMMUNG DES ACE IN VERSCHIEDENEN KÖRPERFLÜSSIGKEITEN

Die Untersuchungen wurden in Seminalplasmen von Patienten mit Normozoospermie durchgeführt. Als Vergleich wurde ein Patientenkollektiv vor und nach Vasektomie untersucht. Weitere Aktivitätsbestimmungen wurden in Prostataexprimaten und "gewaschenen" Spermatozoen, die von Patienten mit Normozoospermie stammten, durchgeführt.

Als vergleichende Untersuchung zum Genitalsystem des Mannes bezüglich der Quantität der ACE-Aktivität wurden Blutseren männlicher und weiblicher Patienten untersucht.

Näheres über Gewinnung und Aufbereitung der Seminalplasmen, Prostataexprimat und Blutseren ist in 4.1. bzw. 4.3. beschrieben.

4.4.1. SEMINALPLASMA BEI NORMOZOOSPERMIE

Untersucht wurde ein Patientenkollektiv mit Normozoospermie ($n = 30$). Hierbei bewegte sich die Spermatozoenzahl zwischen 40 und 150 Millionen/Milliliter (99). Die Fertilität war bei dieser Gruppe nicht eingeschränkt. Eingeschränkte Fertilität ist bei Polyzoospermie (> 250 Mill./ml) und Oligozoospermie (10 - 20 Mill./ml) zu erwarten. Infertilität liegt bei Kryptozoospermie, Azoospermie sowie Aspermie vor.

4.4.2. PRÄ- UND POSTOPERATIVES SEMINALPLASMA BEI VASEKTOMIERTEN PATIENTEN

Vasektomie ist eine operative Kontrazeptionsmethode des Mannes, die meist den endgültigen Verlust der Zeugungsfähigkeit mit sich bringt (2). Von einem beidseitigen Skrotalschnitt aus werden die Ductus deferentes auf eine Strecke von 2-3 cm reseziert. Die freien Enden werden umgestülpt, mit dem Thermokauter koaguliert und dann unterbunden (36).

Untersucht wurden die prä- und postoperativen Seminalplasmen von 5 Patienten.

4.4.3. PROSTATAEXPRIMATE BEI NORMOZOOSPERMIE

Das Seminalplasma macht ca. 95 % des Gesamtejakulatvolumens aus, woran die Sekrete der Prostata mit bis zu 30 % beteiligt sind (vgl. 1.2.). Dieses Prostatasekret ist bei Split-Ejakulaten zum überwiegenden Teil in der ersten Fraktion enthalten.

Untersucht wurden 15 Prostataexprimate von Patienten der Urologischen Abteilung der Landeskrankenanstalten Salzburg/Österreich. Die Lagerung erfolgte bei -20°C ohne Zusätze. Aus technischen Gründen wurde die ACE-Aktivität in verdünntem Zustand (Verdünnung 1:10) gemessen.

4.4.4. "GEWASCHENE" SPERMATOZOEN

In Zusammenarbeit mit anderen zur Zeit laufenden Untersuchungen in unserem Labor (69) wurden "gewaschene" Spermatozoen auf eine etwaige ACE-Aktivität untersucht.

Dabei wurden von 10 Patienten Suspensionen "gewaschener" Spermatozoen (Technik des Waschvorgangs, siehe 4.4.4.1.) hergestellt und nach der Methode von Cushman et al. (14) die ACE-Aktivität bestimmt. Beim Test wurden jeweils 10 μl Spermatozoensuspension verwendet.

Zur Quantifizierung der ACE-Aktivität pro Anzahl Spermatozoen/ml erfolgte anschließend eine Auszählung der Spermatozoen in einer Neubauer-Zählkammer (siehe 4.4.4.2.). Die gemessene ACE-Aktivität wurde auf 100 Millionen Spermatozoen/ml bezogen.

4.4.4.1. AUFBEREITUNG DER SPERMATOZOEN

Die Zentrifugation der Ejakulate erfolgte nach Verflüssigung (nach ca. 2 Stunden) mit der Eppendorf Zentrifuge (Typ 5414, 16000 x g, 3 min, 22°C). Der Überstand wurde mit der Wasserstrahlpumpe entfernt.

Der Waschvorgang erfolgte nach Stegmayr et al. (97):

Die Spermatozoen im Sediment wurden in 5 ml isotonem Puffer (0,05 M Tris-HCl, 138 mM NaCl, 1 mM MgCl, pH 7,32) bei 22° C dreimal gewaschen. Zwischen den Waschvorgängen wurden die Suspensionen jeweils 20 min bei 22° C und 350 x g zentrifugiert (Typ 4123, Heraeus-Christ GmbH). Die Überstände wurden verworfen. Zur ACE-Bestimmung wurde das gewaschene Spermatozoen Sediment in 5 ml Puffer nach Stegmayr resuspendiert.

Durch das dreimalige Waschen mit Puffer konnte ein Einfluß von Seminalplasma-ACE auf die Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Spermatozoen-ACE ausgeschlossen werden.

Allgemein kam es durch die Zentrifugations- und Waschvorgänge zu einem Motilitätsverlust der Spermatozoen. Durch den Waschprozeß kam es auch zu einem Verlust von Spermatozoen aus dem Ejakulat (20, 34, 35, 57, 112).

4.4.4.2. BESTIMMUNG DER SPERMATOZOENZAHL

Die Auszählung der Spermatozoen erfolgte in der Neubauer-Zählkammer. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen (83):

Das gewaschene Spermatozoen-Sediment wurde 1:20 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Ein Tropfen dieser Verdünnung wurde auf die Neubauer-Zählkammer gebracht. Unter dem Mikroskop (Zeiss 473028; Objektiv Neofluar 6,3/0,20 160/-) wurden 4 von 16 Feldern ausgezählt.

Die Berechnung der Zahl der Spermatozoen/ml erfolgte anhand einer vorgegebenen Tabelle (Abb. 14)(83).

ABB. 14: BERECHNUNG DER SPERMATOZOENZAHL (MILL./ML):

Ausgezählte Spermatozoen	Anzahl Spermatozoen (Mill./ml)	Ausgezählte Spermatozoen	Anzahl Spermatozoen (Mill./ml)
10	3,1	360	112,5
20	6,2	380	118,7
30	9,3	400	125,0
40	12,5	420	131,2
50	15,6	440	137,5
60	18,6	460	143,7
70	21,8	480	150,0
80	25,0	500	156,2
90	28,1	520	162,5
100	31,2	540	168,7
120	37,5	560	175,0
140	43,7	580	181,2
160	50,0	600	187,5
180	56,2	620	193,7
200	62,5	640	200,0
220	68,7	660	206,2
240	75,0	680	212,5
260	81,2	700	218,7
280	87,5	720	225,0
300	93,7	740	231,2
320	100,0	760	237,5
340	106,2	780	243,7

ABB. 14: FORTSETZUNG:

Ausgezählte Spermatozoen	Anzahl Spermatozoen (Mill./ml)	Ausgezählte Spermatozoen	Anzahl Spermatozoen (Mill./ml)
800	250,0	920	287,5
820	256,2	940	293,7
840	262,5	960	300,0
860	268,7	980	306,2
880	275,0	1000	312,5
900	281,2		

4.4.5. BLUTSERUM

Als Vergleich zum Genitalsystem des Mannes wurden jeweils in 15 Seren von männlichen und weiblichen Patienten die ACE-Aktivität bestimmt. Die Zentrifugation des Blutes wurde vom klinischen Labor der Dermatologischen Universitätsklinik München durchgeführt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C ohne Zusätze.

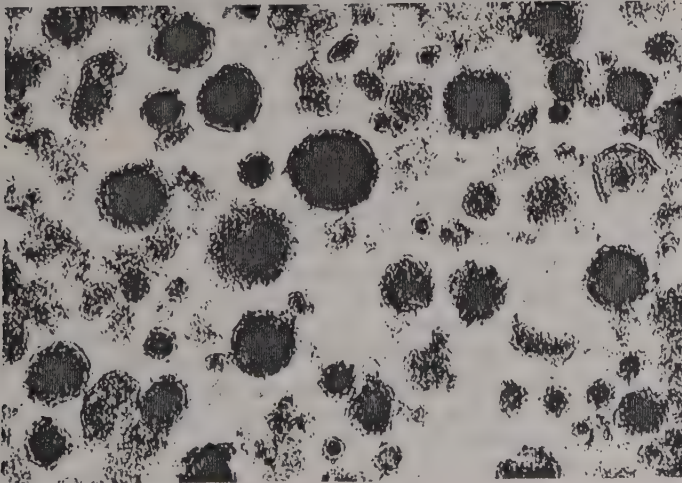
4.5. BESTIMMUNG DER ACE-AKTIVITÄT IN MEMBRANVESIKELN

4.5.1. ALLGEMEINES ÜBER SEMINALPLASMA-MEMBRANVESIKEL

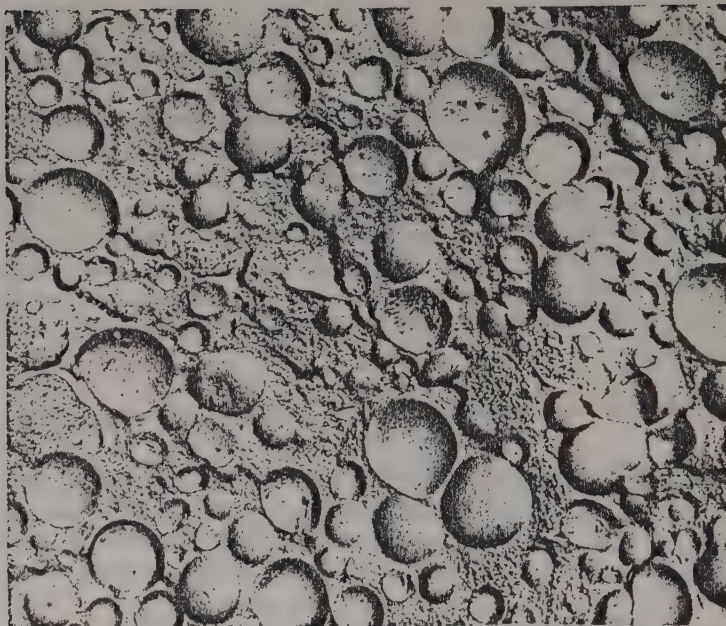
Zentrifugiert man das Ejakulat oder Seminalplasma bei $2500 \times g$ 10 min bei $22^{\circ}C$, so bleiben Membranvesikel im Überstand zurück (97). Stegmayr et al. bezeichneten diese Membranvesikel als Prostatasomen. Nach den Erkenntnissen von Stegmayr stammen sie wahrscheinlich aus der Prostata, nach den Ergebnissen unseren Labors auch aus dem Hoden und dem Nebenhoden. Sie haben möglicherweise eine Funktion bei der Regulation der Spermatozoen-Motilität. Sie sind im Elektronenmikroskop darstellbar (Abb. 15).

ABB. 15: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG VON MEMBRANVESIKELN

a: Die Membranvesikel werden in gepufferter Glutaraldehydlösung fixiert, mit Osmium-Tetroxid behandelt und in Epon/Araldit eingebettet. Dünnschnitte werden auf Goldgrids aufgebracht.



b: Darstellung durch Freeze-etching



Native Membranvesikel, erhalten aus gepooltem Seminalplasma durch Zentrifugation bei 106000 x g wurden in Puffer (Tris-Acetat, pH 7,4, 0,25 mol/l Saccharose) suspendiert und mit 15 % (v/v) Glycerin versetzt und 12 Stunden bei 4 ° C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in flüssigem n-Propan eingefroren und bei -196 ° C gelagert. Das Pellet wurde dann bei -130 ° C gebrochen, geätzt und mit Platin rotationsbedampft. Organisches Material wurde durch Chromsäure-Behandlung entfernt. Die Replika wurde auf Formvar-Grids aufgebracht und im Elektronenmikroskop analysiert.

Der Gehalt der Membranvesikel an Calcium, Magnesium und Zink übertrifft den des Seminalplasma um ein Mehrfaches (98). Dagegen ist die Proteinkonzentration, wenn sie nach Lowry (57) bestimmt wird, relativ gering. Die niedrigen gemessenen Proteinkonzentrationen der Vesikel könnten allerdings auch durch Störungen der Bestimmung durch die Vesikel-Lipide bedingt sein.

Es ist bekannt, daß diese Membranvesikel die gesamte ATP-ase - Aktivität (E.C.3.6.1.3.), einen Teil der sauren Phosphatase - Aktivität (E.C.3.1.3.2.), den Großteil der L-Leucinaminopeptidase Aktivität (E.C.3.4.11.1.) sowie einen Teil des calciumbindenden Proteins Calmodulin des Seminalplasma enthalten (63).

4.5.2. ISOLIERUNG DER MEMBRANVESIKEL

Gepooltes Ejakulat aus der Andrologischen Ambulanz wurde bei 250 x g 30 min bei 4° C zentrifugiert (Zentrifuge Typ 4123, Heraeus-Christ GmbH, Osterode). Das Seminalplasma wurde abpipettiert, in zwei gleiche Volumina aufgeteilt und zentrifugiert.

Teil 1: Zentrifugation bei 50000 x g, 90 min, 4° C
(Sorvall RC - 5B Zentrifuge, Du Ponts Instruments)

Teil 2: Zentrifugation bei 106000 x g, 11 Stunden, 4° C
(Ultrazentrifuge Beckman)

Der Überstand wurde jeweils abpipettiert. Das Sediment wurde in Puffer nach Stegmayr (97) resuspendiert.

4.5.3. ACE-BESTIMMUNG

Als Basiswert wurde eine ACE-Bestimmung in gepooltem und 1:10 mit Puffer (0,5 M K_2HPO_4 , 1,5 M NaCl, pH 8,3) verdünntem Seminalplasma durchgeführt.

Nach der Abtrennung der Membranvesikel gemäß 4.5.2. wurde in den jeweiligen Überständen und resuspendierten Sedimenten die ACE-Aktivität bestimmt.

4.6. GELCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR VERTEILUNG DER ACE AKTIVITÄT IM SEMINALPLASMA

Die Experimente wurden durchgeführt, um ein Verteilungsmuster der ACE-Aktivität in gelfiltriertem Seminalplasma und um Hinweise auf den Anteil der einzelnen Organe des männlichen Genitaltrakts an der Sekretion des ACE im Seminalplasma zu erhalten. Hierzu war die Bestimmung der spezifischen Aktivität von ACE erforderlich.

Definition für reine Enzyme:

Spezifische Aktivität = Unit/mg Protein

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (57).

Für die Gelfiltrationen wurden folgende Geräte verwendet:
Peristaltic Pump P-1, Fraction Collector Frac-100, Printer
(Fa. Pharmacia Fine Chemicals)

Als stationäre Phase wurde Sepharose 6B (Gelbettvolumen 1,5 cm x 47 cm) verwendet.

Eluiert wurde mit Puffer nach Stegmayr et al. (97).

4.6.1. GELFILTRATION VON MEMBRANVESIKELN

4.6.1.1. ISOLIERTE MEMBRANVESIKEL

Membranvesikel wurden durch Ultrazentrifugation bei $106000 \times g$, 11 Stunden, $4^{\circ} C$ (siehe 4.5.2.) aus gepooltem Seminalplasma isoliert, das Pellet in Puffer (97) suspendiert und 1,5 ml dieser Suspension mit Sepharose 6B als stationäre Phase gelfiltriert. Die ACE-Aktivität wurde anschließend im Säuleneluat bestimmt. Der Testansatz bestand aus 240 μl Substratpuffer und 10 μl Säuleneluat. Gleichzeitig wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry in den entsprechenden Membranvesikelfractionen durchgeführt.

4.6.1.2. UNTERSUCHUNG DER STABILITÄT DER MEMBRANVESIKEL

Um die Stabilität der Membranvesikel zu untersuchen, wurden sie einer Gefrierschock-Behandlung unterzogen.

Es wurde folgendermaßen vorgegangen:

Isolierte Membranvesikel eines Seminalplasmapools wurden in zwei gleiche Volumina aufgeteilt.

- Teil 1 wurde gelfiltriert (Bedingungen siehe 4.6.). Im Eluat wurde eine ACE- und Proteinbestimmung durchgeführt.
- Teil 2 wurde 10mal bei $-20^{\circ} C$ ohne Zusätze eingefroren und innerhalb einer Minute wieder aufgetaut. Danach erfolgte die Gelfiltration (siehe 4.6.). Im Eluat wurde die ACE-Aktivität und die Proteinkonzentration bestimmt.

Jeweils 1,5 ml der Membranvesikel-Suspensionen wurden für die Gelfiltration verwendet.

4.6.1.3. SOLUBILISIERUNG DER MEMBRANVESIKEL

Zur Solubilisierung wurden Membranvesikel mit Cholsäure - Na-salz ($C_{24}H_{39}O_5 \times Na$, 1% w/v) in PBS-Puffer 24 Stunden bei $4^{\circ}C$ inkubiert.

Zusammensetzung des PBS-Puffers:

- 0,003 KH_2PO_4 mol/l
- 0,009 Na_2HPO_4 mol/l
- 0,154 NaCl mol/l

Der Ansatz wurde dann 15 min bei $40000 \times g$ ($4^{\circ}C$) zentrifugiert (Sorvall RC - 5B Zentrifuge, Du Ponts Instruments). Der Überstand wurde abpipettiert. 2 ml des Überstands von der Membranvesikelsuspension wurden mit Sepharose 6B als stationäre Phase gelfiltriert. Die ACE-Aktivität im Eluat wurde bestimmt.

4.6.2. GELFILTRATION VON SEMINALPLASMA

Seminalplasmen von 10 Patienten der Andrologischen Ambulanz wurden mit Sepharose 6B als stationäre Phase gelfiltriert. Dabei wurden jeweils 2,5 ml Seminalplasma auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde die ACE-Aktivität in den einzelnen Fraktionen bestimmt. Gleichzeitig wurde eine Proteinbestimmung in den einzelnen Fraktionen durchgeführt.

4.6.3. GELFILTRATION VON PROSTATAEXPRIMAT

Prostataexprime von 5 Patienten der Urologischen Abteilung der Landeskrankenanstalten Salzburg/Österreich, gewonnen durch rektale Massage, wurden gelfiltriert (Sepharose 6B). Dabei wurde jeweils 1,0 ml Prostataexprimat auf die Säule aufgetragen. Eine ACE- sowie Proteinbestimmung wurde in den einzelnen Fraktionen durchgeführt.

4.7. VERGLEICH DER EIGENSCHAFTEN DES ANGIOTENSIN-CONVERTING-ENZYME IN SEMINALPLASMA UND BLUTSERUM

4.7.1. TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DER ACE-AKTIVITÄT

Die ACE-Aktivitäten in Seminalplasma und Blutserum wurden bei verschiedenen Temperaturen bestimmt.

Verwendet wurde ein 1:10 mit Puffer (0,5 mol/l K_2HPO_4 , 1,5 mol/l NaCl, pH 8,3) verdünnter Seminalplasmapool, erhalten von Patienten der Andrologischen Ambulanz sowie gepooltes Serum von männlichen und weiblichen Patienten der Dermatologischen Universitätsklinik München. Die Gewinnung der Seren erfolgte durch das klinische Labor.

Die ACE-Aktivität wurde nach Cushman et al. (14) bestimmt.

Die 30-minütige Inkubation wurde bei folgenden Temperaturen im Wasserbad durchgeführt:

20° C, 25° C, 30° C, 32° C, 35° C, 37° C, 38° C, 40° C, 45° C

4.7.2. EINFLUSS VERSCHIEDENER SUBSTRATKONZENTRATIONEN AUF DIE ACE-AKTIVITÄT

Die ACE-Bestimmung nach Cushman et al. wurde mit verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt.

Verwendete HHL-Konzentrationen:

0,15 mmol/l, 0,17 mmol/l, 0,20 mmol/l, 0,25 mmol/l, 0,30 mmol/l, 0,50 mmol/l, 1 mmol/l, 3 mmol/l, 4 mmol/l, 5 mmol/l, 7 mmol/l

Das ACE stammte aus einem 1:5 mit Puffer (0,5 mol/l K_2HPO_4 , 1,5 mol/l NaCl, pH 8,3) verdünntem Seminalplasmapool sowie gepooltem Serum männlicher und weiblicher Patienten der Dermatologischen Universitätsklinik München. Die Versuchsdurchführung erfolgte gemäß 4.2.3., wobei für jede Substratkonzentration eine Leerwertbestimmung und eine Vierfachbestimmung der Enzymaktivität durchgeführt wurde.

Die Ermittlung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\max}$ sowie der Michaeliskonstante k_m erfolgte rechnerisch (15) sowie graphisch aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm (55). Es wurden jeweils fünf Messungen durchgeführt.

4.7.3. EINFLUSS VERSCHIEDENER INHIBITOREN AUF DIE ACE-AKTIVITÄT

Die Inhibitor-Eigenschaften von Captopril und Gossypol-Acetic-Acid auf die ACE-Aktivität aus Seminalplasma wurden im Andrologischen Labor der Dermatologischen Universitätsklinik München bereits früher untersucht (Abb. 16) (51, 52, 53).

ABB. 16: INHIBITOREN VON ACE AUS HUMANEM SEMINALPLASMA:

Inhibitor	$v_{\max}$ ($\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$)	k_i (mol)
Captopril	3,17	$5,0 \times 10^{-9}$
Gossypol-acetic-acid	2,95	$7,0 \times 10^{-5}$

Unter Verwendung weiterer spezifischer Inhibitoren für ACE wurden die katalytischen Eigenschaften von ACE in Seminalplasma untersucht. Der Einfluß bekannter Peptidase-Inhibitoren auf die ACE-Aktivität wurde ebenfalls untersucht.

Hierzu wurde die ACE-Aktivität von Seminalplasma durch Gelfiltration (stationäre Phase: Sepharose 6B) angereichert. In den Eluatn wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt. Nach Ermittlung der spezifischen ACE-Aktivitäten in den einzelnen Fraktionen wurden die drei Fraktionen mit den höchsten spezifischen ACE-Aktivitäten gepoolt und für die Inhibitor - Untersuchungen verwendet. Die Lagerung erfolgte bei -20°C ohne Zusätze.

Vergleichend wurden entsprechende Experimente auch mit ACE aus Blutserum, dessen Aktivität ebenfalls durch Gelfiltration

(stationäre Phase: Sepharose 6B) angereichert worden war, durchgeführt.

In den verwendeten Pools lag nun eine Anreicherung, d.h. eine Erhöhung der spezifischen ACE-Aktivitäten vor. Somit wurden mögliche Störfaktoren, wie z.B. unspezifische Peptidasen, die vor allem in Serum vorhanden sind, weitgehend ausgeschlossen.

Versuchsdurchführung:

Als Basiswert wurde jeweils die ACE-Aktivität (nach Cushman et al.) in angereichertem und gelfiltriertem Seminalplasma sowie in entsprechend behandeltem Serum bestimmt.

Der Testansatz bestand aus 240 μ l Substratpuffer und 10 μ l Seminalplasma- bzw. Serumpool (vgl 4.2.3.).

Von den einzelnen Inhibitoren wurden zunächst einmolare Stammlösungen mit Puffer (0,5 mol/l K_2HPO_4 , 1,5 mol/l NaCl, pH 8,3) hergestellt. Hiervon wurden geometrische Verdünnungsreihen mit Substratpuffer hergestellt (Abb. 17).

Der Testansatz bestand aus 230 μ l Substratpuffer, 10 μ l Inhibitorlösung und 10 μ l Seminalplasma- bzw. Serumpool. Die weitere Versuchsdurchführung verlief wie beschrieben (vgl 4.2.3.).

Von jeder Inhibitor-Konzentration wurden jeweils fünf Messungen durchgeführt.

Die Berechnung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten v_{max} und der Inhibitorkonstanten k_i erfolgte graphisch aus dem Dixon-plot (16). Darunter versteht man die graphische Darstellung mit den Funktionspaaren $(I; \frac{1}{v})$, wobei I die Hemmstoffkonzentration und v die umgesetzte Substratmenge pro Zeiteinheit darstellen.

ABB. 17: VERDÜNNUNGSREIHE UND DARAUS RESULTIERENDE MOLARE KONZENTRATION DER VERWENDETEN INHIBITOREN:

Verdünnung	Konzentration (mol/l)
1:1	1
1:2	5×10^{-1}
1:4	$2,5 \times 10^{-1}$
1:8	$1,25 \times 10^{-1}$
1:16	$6,25 \times 10^{-2}$
1:32	$3,13 \times 10^{-2}$
1:64	$1,67 \times 10^{-2}$
1:128	$7,80 \times 10^{-3}$
1:256	$3,90 \times 10^{-3}$
1:512	$1,95 \times 10^{-3}$
1:1024	$9,76 \times 10^{-4}$
1:2048	$4,88 \times 10^{-4}$
1:4096	$2,44 \times 10^{-4}$
1:8192	$1,22 \times 10^{-4}$
1:16384	$6,10 \times 10^{-5}$
1:32768	$3,05 \times 10^{-5}$
1:65536	$1,53 \times 10^{-5}$
1:131072	$7,63 \times 10^{-6}$
1:262144	$3,81 \times 10^{-6}$
1:524288	$1,91 \times 10^{-6}$
1:1048576	$9,53 \times 10^{-7}$
1:2097152	$4,76 \times 10^{-7}$
1:4194304	$2,38 \times 10^{-7}$
1:8388608	$1,19 \times 10^{-7}$
1:16777216	$5,96 \times 10^{-8}$

4.7.3.1. BRADYKININ

Bradykinin (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) gehört neben Kallidin und Methionylkallidin zu den Plasmakininen. Bezüglich der chemischen Verwandtschaft dieser drei Kinine sei auf Abb. 3 verwiesen.

Bradykinin ist ein Nonapeptid, das als sog. Gewebshormon auf zellulärer Ebene biologisch aktiv wird. Es erhöht die Kapillarpermeabilität, wirkt stark vasodilatatorisch, senkt somit den Blutdruck und löst lokale Gewebsreaktionen aus, d.h. es verursacht Ödeme, Leukozytenmigration und Schmerz am Ort einer Gewebsschädigung. Außerdem kontrahiert es die Muskulatur von Uterus und Intestinum (24, 111). Aufgrund der Uteruskontraktion könnte Bradykinin eine Wirkung auf den intrauterinen Spermatozoentransport haben (10).

Bradykinin wird unter Abspaltung des Dipeptids Phe-Arg von ACE in vivo inaktiviert.

Bei diesem Versuch wurde mit Bradykinin als Inhibitor (eingesetzt als Bradykinin-Triacetat) eine Substrathemmung der ACE-Aktivität durchgeführt. Hierzu wurde zunächst eine einmolare Stammlösung von Bradykinin-Triacetat ($M = 1240,8$) mit Substratpuffer und dann eine Verdünnungsreihe in Form einer geometrischen Reihe bis zu einer Verdünnung von 1:2048 ($4,88 \times 10^{-4}$ mol/l) mit Substratpuffer hergestellt (Abb. 17). Die weitere Versuchsdurchführung verlief wie unter 4.2.3. beschrieben. Die Substrathemmung mit Bradykinin wurde mit angereichertem ACE aus Seminalplasma und Serum für jede Konzentration jeweils fünfmal durchgeführt.

4.7.3.2. KALLIDIN

Kallidin (Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) gehört ebenso wie Bradykinin und Methionylkallidin zu den Kininen (Abb. 3).

Kallidin zeigt ähnliche biologische Wirkungen wie Bradykinin. Da diskutiert wird, daß bei hohen Kininkonzentrationen dessen Abbauprodukte eine kompetitive Hemmung auf das ACE ausüben (30), lag der Schluß nahe, neben Bradykinin auch die anderen Kinine

hinsichtlich ihrer ACE-Hemmung zu untersuchen.

Hierzu wurde Kallidin-Triacetat (M = 1368) verwendet. Die Versuchsdurchführung verlief analog dem Hemmversuch mit Bradykinin.

4.7.3.3. METHIONYALKALLIDIN

Methionylkallidin (Met-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) wurde als drittes Plasmakinin zur Untersuchung einer etwaigen Hemmung der ACE-Aktivität verwendet. Hinsichtlich seiner physiologischen Eigenschaften verhält es sich ähnlich wie die anderen untersuchten Kinine. Ihre Wirkung auf die glatte Muskulatur des Uterus und Darmes nimmt jedoch mit der Kettenlänge der Kinine ab. Dagegen nimmt die Wirkung auf den Blutdruck und die Gefäßpermeabilität mit der Kettenlänge zu (24, 111).

Verwendet für die Messung wurde L-Met-L-Bradykinin-Triacetat (M = 1446). Die Versuchsdurchführung verlief analog den Hemmversuchen der anderen Kinine.

4.7.3.4. ANGIOTENSIN I

Angiotensin I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) ist ein Dekapeptid, das aus dem in der Leber gebildeten Angiotensinogen durch Renin freigesetzt wird. Angiotensin I ist nur schwach vasokonstriktorisch wirksam. Erst das durch die Aktivität des ACE aus dem Angiotensin I durch Abspaltung eines Dipeptids gebildete Angiotensin II ist ein starker Vasokonstriktor.

Bei diesem Versuch wurde der hemmende Einfluß von Angiotensin I (M = 1297) auf die ACE-Aktivität untersucht. Die Versuchsdurchführung entsprach in allen Einzelheiten den anderen Kinin-Hemmversuchen.

4.7.3.5. ANGIOTENSIN II

Angiotensin II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) ist das Produkt der katalytischen Umsetzung von Angiotensin I durch ACE. Es verengt die peripheren Gefäße und steigert dadurch den Blutdruck. Bei verminderter Durchblutung und Hypoxie der Niere wird es vermehrt gebildet und ist eine Teilursache des renalen Hypertonus.

Durch Angiotensin II wird auch die Aldosteronproduktion in der Nebennierenrinde stimuliert.

Der Einfluß von Angiotensin II (M = 1046) auf die ACE-Aktivität wurde untersucht. Vom Prinzip her handelt es sich dabei um eine Produkthemmung. Die Versuchsdurchführung entsprach den bereits durchgeführten Hemmversuchen.

4.7.3.6. ANGIOTENSIN III

Angiotensin III kann auf zweierlei Wegen gebildet werden:

- Durch katalytische Umsetzung von Angiotensin I in des-Asp-Angiotensin I durch Angiotensinase A und anschließender Umwandlung von des-Asp-Angiotensin I durch ACE.
- Durch direkte Umsetzung von Angiotensin II in Angiotensin III durch Angiotensinasen, welche wiederum Angiotensin III in inaktive Fragmente abbauen können.

Angiotensin III hat keine Wirkung auf die Gefäße, stimuliert aber in der Nebennierenrinde die Aldosteronbildung. Die Hemmung von Angiotensin III führt zur Blockade des RAS sowie zu Blutdruckabfall (12).

Es wurde nun mit Angiotensin III (M = 931) als Inhibitor die Hemmung der ACE-Aktivität untersucht. Die Versuchsdurchführung verlief entsprechend den bereits durchgeführten Hemmversuchen.

4.7.3.7. D-PHENYLALANYL-L-PHENYLALANYL-L-ARGININ CHLOROMETHYLKETON

Nach Kettner und Shaw (48) ist D-Phe-Ala-L-Phe-Ala-L-Arg Chloromethylketon ein synthetisches Oligopeptid-Analogon, das ein starker Inhibitor für Kallikreine mit einer k_1 von 10^{-9} mol/l ist. Da ACE das regulatorische Schlüsselenzym des KKS ist, lag es nahe einen etwaigen inhibitorischen Einfluß von D-Phe-Ala-L-Phe-Ala-L-Arg Chloromethylketon auf die ACE-Aktivität zu untersuchen. Verwendet wurde für die Messung lyophilisiertes D-Phe-Ala-L-Phe-Ala-L-Arg Chloromethylketon Dihydrochlorid ($M = 609$). Die Versuchsdurchführung entsprach den bereits durchgeführten Hemmversuchen.

4.7.3.8. BRADYKININ POTENTIATOR B (96)

Bradykinin Potentiator B (Pyr-Gly-Leu-Pro-Pro-Arg-Pro-Lys-Ile-Pro-Pro) ist eines jener 11 Peptide des Schlangengifts der Viper *Bothrops jaracca*, das die Wirksamkeit von Bradykinin erhöht und die Aktivität der Bradykininase vermindert (96) (Näheres hierzu 2.1.3.). Dieses Peptid wurde neben vier anderen die Bradykinin-Aktivität steigernden Peptiden auch aus dem Gift der Viper *Agkistrodon halys blomhoffii* (44, 45, 46) isoliert. Es wird diskutiert, daß zwei dieser Oligopeptide, nämlich Potentiator B und Potentiator C die ACE-Aktivität *in vitro* hemmen (5, 6, 41, 47), wobei Potentiator B diese Wirkung auch *in vivo* zeigen soll (107). Inzwischen hat sich bestätigt, daß eine Peptidase mit einem Pro-Pro-COOH-terminalen Dipeptid eine Erhöhung der Bradykinin-Aktivität sowie eine Hemmung der ACE-Aktivität herbeiführt (19, 23, 68, 94).

Es lag nun nahe mit diesem Peptid (Bradykinin Potentiator B) als Inhibitor den Einfluß auf die ACE-Aktivität im Seminalplasma im Vergleich zur ACE-Aktivität im Blutserum zu untersuchen. Hierzu wurde Pyr-Gly-Leu-Pro-Pro-Arg-Pro-Lys-Ile-Pro-Pro x Acetat ($M = 1184$) verwendet. Die Versuchsdurchführung verlief entsprechend den bereits durchgeführten Hemmversuchen. Die Herstellung der Verdünnungsreihen in Form einer geometrischen

Reihe erfolgte jedoch bis zu einer Verdünnung von 1:65536 ($1,53 \times 10^{-5}$ mol/l).

4.7.3.9. BRADYKININ POTENTIATOR C (96)

Bradykinin Potentiator C (Pyr-Gly-Leu-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro-Ile-Pro-Pro) ist neben Potentiator B das zweite Polypeptid, das für eine Untersuchung der ACE-Inhibition interessant erscheint. Es besteht eine große strukturelle Ähnlichkeit zwischen diesen beiden Peptiden (Näheres hierzu siehe 4.7.3.8.).

Verwendet für die Messung wurde Pyr-Gly-Leu-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro-Ile-Pro-Pro $\times 3 \text{ H}_2\text{O}$ ($M = 1054$). Die Versuchsdurchführung verlief entsprechend der Inhibition mit Potentiator B.

4.7.3.10. METHIONIN-ENKEPHALIN

Nach den Untersuchungen von Benuck und Marks (7) erweist sich ACE aus dem Gehirn der Ratte identisch mit einer membrangebundenen Dipeptidyl-Carboxypeptidase, welche Met-Enkephalin inaktiviert. Aufgrund einiger inhibitorischer und gelchromatographischer Untersuchungen hat es jedoch den Anschein, daß ACE und Enkephalinase verschiedene Enzyme sind (4, 8, 32, 102, 103).

Hudgin et al. (40) untersuchten nun unter topographischen Gesichtspunkten das Mäusegehirn auf das Vorkommen von Enkephalinase, Aminopeptidase und ACE. Sie stellten hohe ACE-Aktivitäten im Striatum, Hypothalamus und Cerebellum fest. Im Gegensatz dazu waren die Aktivitäten der Enkephalinase und Aminopeptidase im Cerebellum sehr niedrig. Die höchste Enkephalinase-Aktivität wurde im Striatum gefunden. Die Aktivität der Aminopeptidase war im Hypothalamus am höchsten.

Hudgin et al. untersuchten nun den Einfluß verschiedener Peptidinhibitoren auf die Aktivität der Aminopeptidase und der Enkephalinase (40). Dabei stellten sie fest, daß die Enkephaline einen starken inhibitorischen Einfluß mit einer k_i im μMol -Bereich auf die Enkephalinase ausüben.

Es lag nun nahe mit Enkephalinen eine Untersuchung auf einen möglichen inhibitorischen Einfluß auf die ACE-Aktivität im Seminalplasma im Vergleich zur ACE-Aktivität im Blutserum durchzuführen. Stellvertretend für die Enkephaline wurde hierbei Met-Enkephalin ($M = 633,7$) verwendet. Die Versuchsdurchführung verlief entsprechend den bereits durchgeführten Hemmversuchen. Die Herstellung der geometrischen Verdünnungsreihe erfolgte jedoch nur bis zu einer Verdünnung von 1:32 ($3,13 \times 10^{-2}$ mol/l).

4.7.3.11. BESTATIN

Neben Met-Enkephalin wurde von Hudgin et al. auch Bestatin für die inhibitorischen Untersuchungen an Enkephalinase und Amino-peptidase verwendet (40). Dabei erwies sich Bestatin als starker Inhibitor der Amino-peptidase (k_i im μ Mol-Bereich), jedoch als schwacher Enkephalinase-Inhibitor (k_i im mMol-Bereich).

Der Einfluß von Bestatin auf die ACE-Aktivität wurde untersucht. Hierzu wurde Bestatin Hydrochlorid ($M = 344,8$) verwendet. Die Versuchsdurchführung verlief wie vorher angegeben.

4.7.3.12. NEUROTENSIN

Neurotensin hat eine Reihe wichtiger pharmakologischer Eigenschaften. Es führt zu Hochdruck, Hyperglykämie, Darmkontraktion, gesteigerter vaskulärer Permeabilität, zu gesteigerter Wachstumshormonsekretion und zu Hypothermie (33).

Bei den Untersuchungen von Hudgin et al. (40) erwies sich Neurotensin als starker Inhibitor ($k_i = 10^{-6}$ mol/l) sowohl der Enkephalinase als auch der Amino-peptidase.

Für die Messung der ACE-Aktivität wurde Neurotensin (pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-Triacetat) ($M = 1853,1$) verwendet. Die Versuchsdurchführung verlief wie vorher angegeben.

4.7.3.13. ZINCOV^R

Hudgin et al. konnten auch einige neue sehr potente Enkephalinase-Inhibitoren charakterisieren (40). Darunter waren auch zwei Hydroxamido-Säuren des Alanyl-glycin-amids:

- $\text{HO-NHCOCH}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2)\text{-CO-Ala-Gly-NH}_2$
- $\text{HO-NHCOCH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5)\text{-CO-Ala-Gly-NH}_2$

Neben Enkephalinase hemmen diese Inhibitoren auch die Aktivitäten von Thermolysin (50) und einer Endopeptidase des Pankreas (61). Alle diese Enzyme sind Zink-Metalloendoproteasen. Das Zink-Atom scheint eine Komponente des aktiven Zentrums zu sein. Diese Enzyme besitzen auch ein hydrophobes Zentrum, welches in die Substratbindung mit einbezogen zu sein scheint. Alle aktiven Inhibitoren besitzen eine funktionelle Gruppe, die zur Koordination mit dem Zink-Atom des Enzyms in der Lage ist und eine hydrophobe Seitenkette, die mit dem hydrophoben Teil des Enzyms in Wechselwirkung tritt.

Da ACE ebenfalls eine Zink enthaltende Metalloprotease ist, lag es nahe mit den Hydroxamido-Säuren des Alanyl-glycin-amids eine Untersuchung des möglichen inhibitorischen Einflusses der ACE-Aktivität im Seminalplasma und im Vergleich dazu der ACE-Aktivität im Blutserum durchzuführen.

Als Prototyp dieser Inhibitoren wurde Zincov (2-(N-Hydroxycarboxamido)-4-methylpentanoyl-L-alanyl-glycin-amid) ($M = 302,3$) verwendet. Die Versuchsdurchführung verlief wie unter 4.7.3. angegeben. Die Verdünnungsreihen wurden in Form einer geometrischen Reihe bis zu einer Verdünnung von 1:16777216 ($5,96 \times 10^{-8}$ mol/l) erstellt.

4.8. STATISTISCHE ANALYSE

Alle Ergebnisse wurden einer statistischen Analyse unterzogen (113). Dabei wurden wenn möglich jeweils folgende Parameter berechnet:

- Arithmetisches Mittel $\bar{x}_A$
- Standardabweichung (s) σ_{n-1}
- Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ
- Varianz (s^2)
- Variationskoeffizient VK
- Konfidenzintervall mit $(1 - \alpha) = 95 \%$

Als statistische Verfahren zur Berechnung von unterschiedlichen Signifikanzniveaus zwei oder mehrerer Stichproben wurden folgende spezielle statistische Testverfahren verwendet:

- t-Test für abhängige Stichproben
- t-Test für unabhängige Stichproben
- Link-Wallace-Test

Als Vortests wurden dabei verwendet:

- F-Test: Test zur Überprüfung auf gleiche Varianz
- Test nach David, Pearson und Stephens: Test zur Überprüfung einer Normalverteilung

5. E R G E B N I S S E

5.1. CHARAKTERISIERUNG DER ACE-BESTIMMUNG NACH CUSHMAN ET AL.

5.1.1. LINEARITÄT

Die Überprüfung der Linearität erfolgte mit 5 unterschiedlichen Seminalplasmaproben, die folgendermaßen verdünnt wurden:

1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:10; 1:16; 1:20

Wegen der hohen ACE-Aktivität im Seminalplasma waren bei allen Proben die 1:1 - Verdünnungen nicht verwertbar. Bei jeweils drei Proben waren die 1:2 - Verdünnungen sowie aufgrund zu niedriger ACE-Aktivität die 1:20 - Verdünnungen nicht verwertbar.

Die Ergebnisse sind in Abb. 18 zusammengefaßt:

ABB. 18: LINEARITÄTSÜBERPRÜFUNG:

		Proben				
		1	2	3	4	5
Extinktion (228 nm) unterschied- licher Verdünnungen	1:1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
	1:2	1,87	n.v.	1,95	n.v.	n.v.
	1:4	0,945	1,015	0,975	1,00	1,025
	1:8	0,47	0,50	0,485	0,50	0,515
	1:10	0,375	0,405	0,390	0,40	0,410
	1:16	0,235	0,255	0,245	0,25	0,255
	1:20	n.v.	0,205	n.v.	n.v.	0,205

Leerwert: 0,2

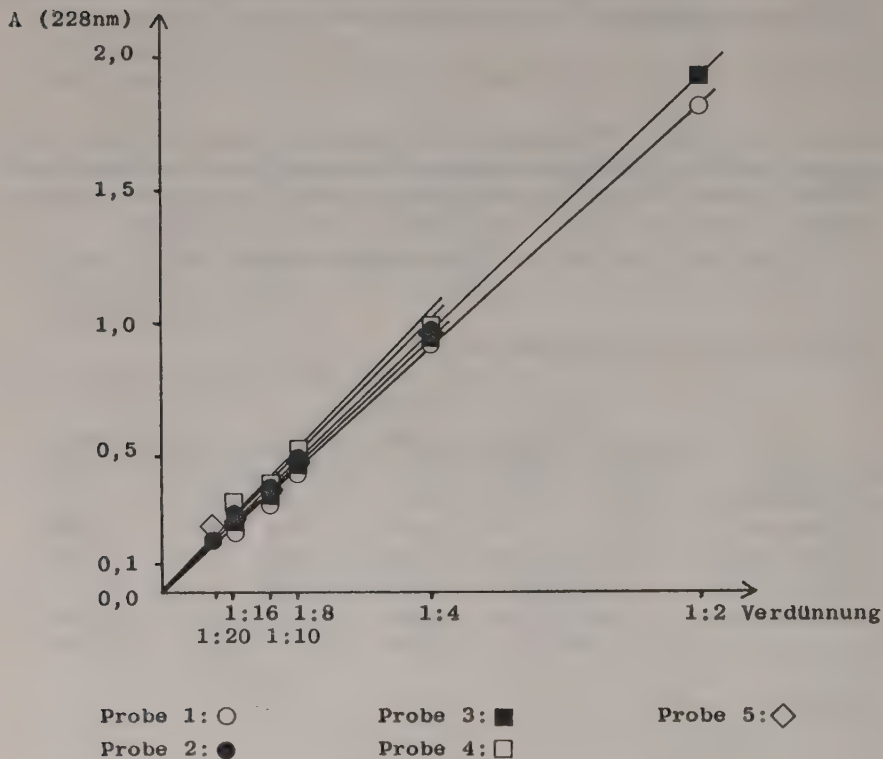
n.v. = nicht verwertbar

Es ergab sich eine lineare Beziehung zwischen der jeweiligen Seminalplasmaverdünnung und den gemessenen Extinktionswerten (Abb. 19). Somit besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration des umgesetzten HHL-Substratpuffers und

verschiedenen ACE-Aktivitäten.

Das Ergebnis des Versuchs zeigte weiter, daß eine Verdünnung von 1:10 für die Bestimmung der ACE-Aktivität im Seminalplasma am zweckmäßigsten erschien.

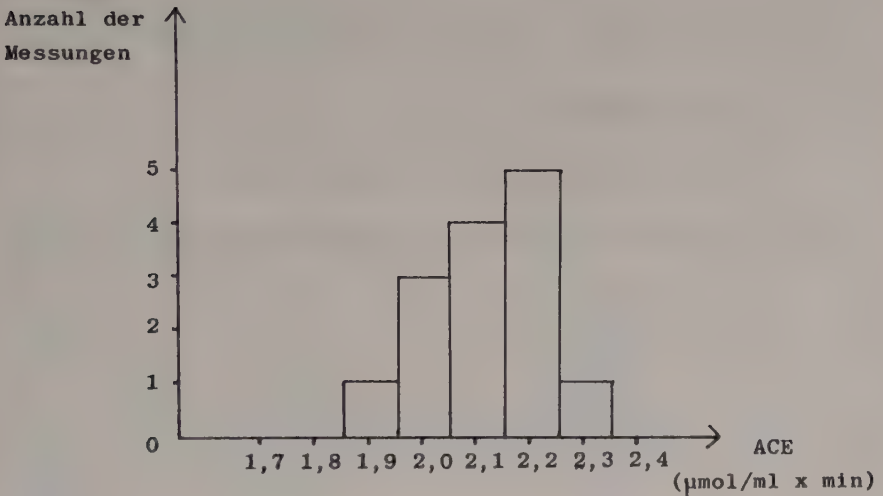
ABB. 19 : LINEARER ZUSAMMENHANG ZWISCHEN SEMINALPLASMAVERDÜNNUNG UND GEMESSENER EXTINKTION:



5.1.2. REPRODUZIERBARKEIT

In 15 Testansätzen mit 1:10 verdünntem Seminalplasma wurde die ACE-Aktivität unter gleichen Testbedingungen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 20 (Histogramm) dargestellt.

ABB. 20: REPRODUZIERBARKEITSÜBERPRÜFUNG (HISTOGRAMM):



Standardabweichung (s) $\sigma_{n-1} = 0,3327$

Varianz (s^2) = 0,1107

Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) $\sigma = 0,0859$

Variationskoeffizient VK = 15,71 %

Konfidenzintervall: $\mu = (2,118 \pm 0,168) \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$
mit $(1 - \alpha) = 95 \%$

μ = Mittelwert der Grundgesamtheit

Der Test nach Cushman et al. erwies sich als reproduzierbar, da er bei n-facher Wiederholung unter gleichen Testbedingungen entsprechend den allgemeinen statistischen Forderungen immer zum gleichen Ergebnis führte.

5.1.3. INTERASSAY-GENAUIGKEIT

Zum Nachweis der Interassay-Genauigkeit wurden 10 verschiedene Seminalplasmen bei einer Verdünnung von 1:10 nach 6-monatiger Lagerung ohne Zusätze bei -20°C erneut gemessen. Es ergaben sich die in Abb. 21 aufgeführten Ergebnisse.

ABB. 21: INTERASSAY-GENAUIGKEIT:

Probe	ACE-Aktivität ($\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$)		
	1. Messung (22.11.83)	2. Messung (22.05.84)	Differenz
1	1,97	2,22	+0,25
2	1,60	1,72	+0,12
3	2,46	2,46	0
4	2,71	2,71	0
5	2,71	2,97	+0,26
6	2,03	2,11	+0,08
7	2,19	2,35	+0,16
8	2,03	2,09	+0,06
9	3,08	2,96	-0,12
10	2,53	2,46	-0,07

Statistische Analyse:

1. Messung: Mittelwert = 2,331 $\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$
Standardabweichung (s) $\sigma_{n-1} = 1,333$
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) $\sigma = 0,4216$
Varianz (s^2) = 1,777
Variationskoeffizient VK = 57,19 %
Konfidenzintervall: $\mu = (2,331 \pm 0,826) \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$
mit $(1 - \alpha) = 95 \%$
2. Messung: Mittelwert = 2,406 $\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$
Standardabweichung (s) $\sigma_{n-1} = 1,205$
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) $\sigma = 0,3809$
Varianz (s^2) = 1,451
Variationskoeffizient VK = 50,07 %
Konfidenzintervall: $\mu = (2,406 \pm 0,747) \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$
mit $(1 - \alpha) = 95 \%$

μ = Mittelwert der Grundgesamtheit

Nach dem t-Test für abhängige Stichproben ergibt sich ein t von 0,194. Der Tabellenwert t_0 für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ und $f = n - 1 = 9$ Freiheitsgrade liegt bei 2,26.

Da t kleiner als der Tabellenwert t_0 ist, wird H_0 mit der entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % bestätigt.

Somit unterscheiden sich die beiden Messungen nicht signifikant, d.h. die Interassay-Genauigkeit des Tests nach Cushman et al. ist gegeben.

5.2. QUANTITATIVE BESTIMMUNG DES ACE IN VERSCHIEDENEN KÖRPERFLUSSIGKEITEN

5.2.1. SEMINALPLASMA BEI NORMOZOOSPERMIE

Von 30 Patienten der Andrologischen Ambulanz wurde jeweils 1:10 verdünntes Seminalplasma mit Normozoospermie auf seine ACE-Aktivität untersucht.

Die Ergebnisse sind in Abb. 22 und Abb. 23 (Histogramm) zusammengefaßt.

ABB. 22 : ACE-AKTIVITÄT IM SEMINALPLASMA BEI NORMOZOOSPERMIE:

Patient	Extinktion (228 nm)	ACE ($\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$)	Differenz Mittelwert
1	0,385	2,156	+0,004
2	0,365	2,044	-0,108
3	0,370	2,072	-0,08
4	0,350	1,960	-0,192
5	0,385	2,156	+0,004
6	0,395	2,212	+0,06
7	0,410	2,296	+0,144
8	0,415	2,324	+0,172
9	0,390	2,184	+0,032
10	0,385	2,156	+0,004
11	0,385	2,156	+0,004
12	0,400	2,240	+0,088
13	0,375	2,100	-0,052
14	0,405	2,268	+0,116
15	0,365	2,044	-0,108
16	0,400	2,240	+0,088
17	0,405	2,268	+0,116
18	0,390	2,184	+0,032
19	0,395	2,212	+0,060
20	0,385	2,156	+0,004
21	0,375	2,100	-0,052
22	0,350	1,960	-0,192

ABB. 22 : FORTSETZUNG:

Patient	Extinktion (228 nm)	ACE ($\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$)	Differenz Mittelwert
23	0,345	1,932	-0,220
24	0,375	2,100	-0,052
25	0,400	2,240	+0,088
26	0,385	2,156	+0,004
27	0,390	2,184	+0,032
28	0,395	2,212	+0,006
29	0,375	2,100	-0,052
30	0,385	2,156	+0,004
Mittelwert	0,384	2,152	

Standardabweichung (s) $\sigma_{n-1} = 0,5077$

Varianz (s^2) = 0,2578

Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) $\sigma = 0,0927$

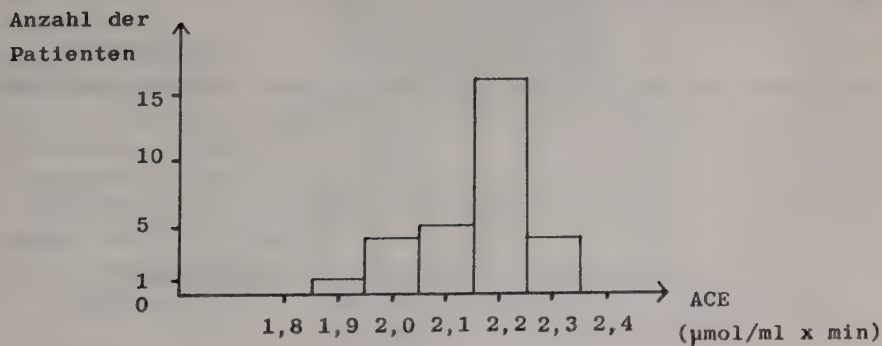
Variationskoeffizient VK = 23,59 %

Konfidenzintervall: $\mu = (2,152 \pm 0,182) \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$

mit $(1 - \alpha) = 95 \%$

μ = Mittelwert der Grundgesamtheit

ABB. 23 : ACE-AKTIVITÄT IM SEMINALPLASMA BEI NORMOZOOSPERMIE:
(HISTOGRAMM)



5.2.2. PRÄ- UND POSTOPERATIVES SEMINALPLASMA BEI VASEKTOMIE

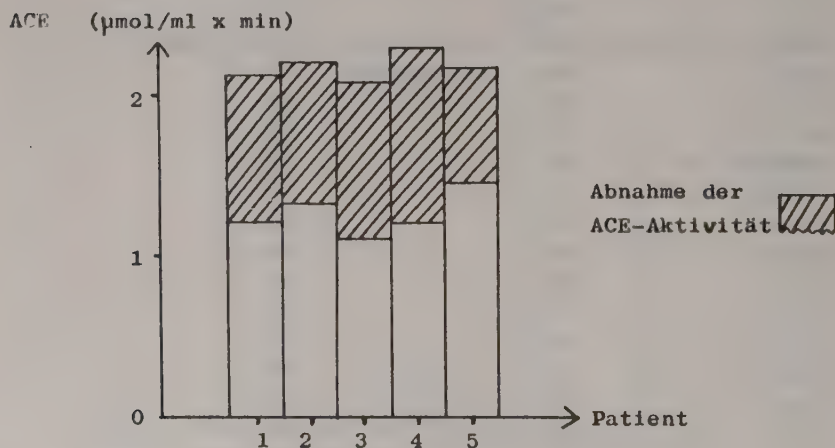
Als Vergleich wurde in Seminalplasmen von 5 Patienten, die sich einer Vasektomie unterzogen hatten, vor und nach dem operativen Eingriff ihre ACE-Aktivität bestimmt.

Es ergaben sich die in Abb. 24 und Abb. 25 aufgezeigten Ergebnisse.

ABB. 24 : ACE-AKTIVITÄT IM SEMINALPLASMA VOR UND NACH VASEKTOMIE:

Patient	ACE ($\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$)		Abnahme der	
	Präoperativ	Postoperativ	Differenz	ACE-Aktivität %
1	2,156	1,238	-0,918	42,58
2	2,212	1,352	-0,860	38,88
3	2,100	1,130	-0,970	46,19
4	2,240	1,195	-1,045	46,65
5	2,184	1,472	-0,712	32,60

ABB. 25 : GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER ACE-AKTIVITÄT IM SEMINALPLASMA VOR UND NACH VASEKTOMIE:



Statistische Analyse:

Präoperatives Seminalplasma:

Mittelwert = $2,178 \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$

Standardabweichung (s) $\sigma_{n-1} = 0,1078$

Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) $\sigma = 0,0482$

Varianz (s^2) = $0,0116$

Variationskoeffizient VK = $4,95 \%$

Konfidenzintervall: $\mu = (2,178 \pm 0,094) \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$

mit $(1 - \alpha) = 95 \%$

Postoperatives Seminalplasma:

Mittelwert = $1,277 \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$

Standardabweichung (s) $\sigma_{n-1} = 0,271$

Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) $\sigma = 0,1212$

Varianz (s^2) = $0,0734$

Variationskoeffizient VK = $21,22 \%$

Konfidenzintervall: $\mu = (1,277 \pm 0,238) \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$

mit $(1 - \alpha) = 95 \%$

μ = Mittelwert der Grundgesamtheit

Nach dem t-Test für abhängige Stichproben ergibt sich ein t von 7,434. Der Tabellenwert t_0 für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ und $f = n - 1 = 4$ Freiheitsgrade liegt bei 2,78.

Da t größer als der Tabellenwert t_0 ist, wird die Nullhypothese H_0 mit der entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% verworfen. Somit besteht ein signifikanter Unterschied der ACE-Aktivitäten von prä- und postoperativem Seminalplasma bei Vasektomie.

Die prozentuale Abnahme der ACE-Aktivität von postoperativem Seminalplasma ist folgendermaßen charakterisiert:

Mittelwert = $41,38 \%$

Standardabweichung (s) $\sigma_{n-1} = 11,65$

Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) $\sigma = 5,209$

Varianz (s^2) = $135,68$

Variationskoeffizient VK = $28,15 \%$

Konfidenzintervall: $\mu = (41,38 \pm 10,21) \%$ mit $(1 - \alpha) = 95 \%$

μ = Mittelwert der Grundgesamtheit

5.2.3. PROSTATAEXPRIMATE BEI NORMOZOOSPERMIE

Als Vergleichsmessung zur Bestimmung der ACE-Aktivität im Seminalplasma bei Normozoospermie (siehe 5.2.1.) wurde von 15 Patienten der Urologischen Abteilung der Landeskrankenanstalten Salzburg/Österreich jeweils 1:10 verdünntes Prostataexprimat bei Normozoospermie auf seine ACE-Aktivität untersucht.

Die Ergebnisse sind in den Abb. 26 bis 28 zusammengefaßt.

ABB. 26: ACE-AKTIVITÄT IM PROSTATAEXPRIMAT IM VERGLEICH ZUR ACE-AKTIVITÄT (ARITHMETISCHES MITTEL, VGL. 5.2.1.) IM SEMINALPLASMA JEWEILS BEI NORMOZOOSPERMIE:

Patient	ACE ($\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$)	Differenz	(Prostataexprimat)	%
	(Prostataexprimat)	vom ACE Mittelwert	(Seminalplasma)	
1	1,495	+0,006	69,47	
2	1,470	-0,019	68,31	
3	1,505	+0,016	69,93	
4	1,490	+0,001	69,24	
5	1,485	-0,004	69,01	
6	1,495	+0,006	69,47	
7	1,480	-0,009	68,77	
8	1,475	-0,014	68,54	
9	1,495	+0,006	69,47	
10	1,490	+0,001	69,24	
11	1,485	-0,004	69,01	
12	1,495	+0,006	69,47	
13	1,500	+0,011	69,70	
14	1,475	-0,014	68,54	
15	1,500	+0,011	69,70	
Mittelwert	1,489		69,19	

Mittelwert der ACE-Aktivität des Seminalplasmas nach 5.2.1:
 $(2,152 \pm 0,182) \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$ mit $(1 - \alpha) = 95 \%$

ABB. 27: ACE-AKTIVITÄT IM PROSTATAEXPRIMAT BEI NORMOZOOSPERMIE:
(HISTOGRAMM)

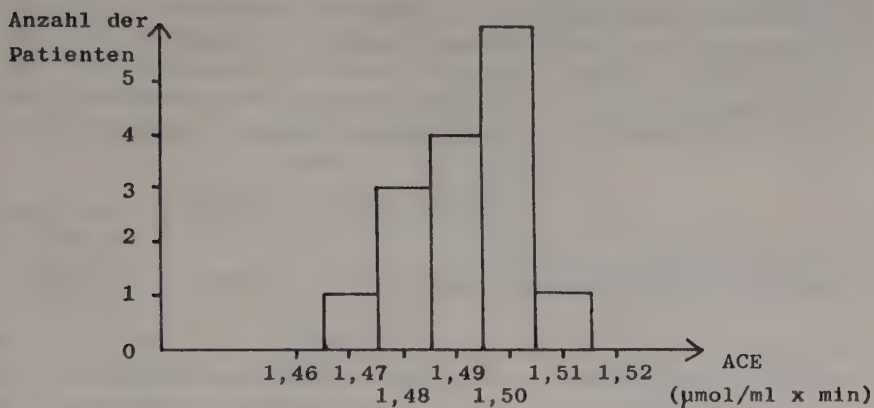
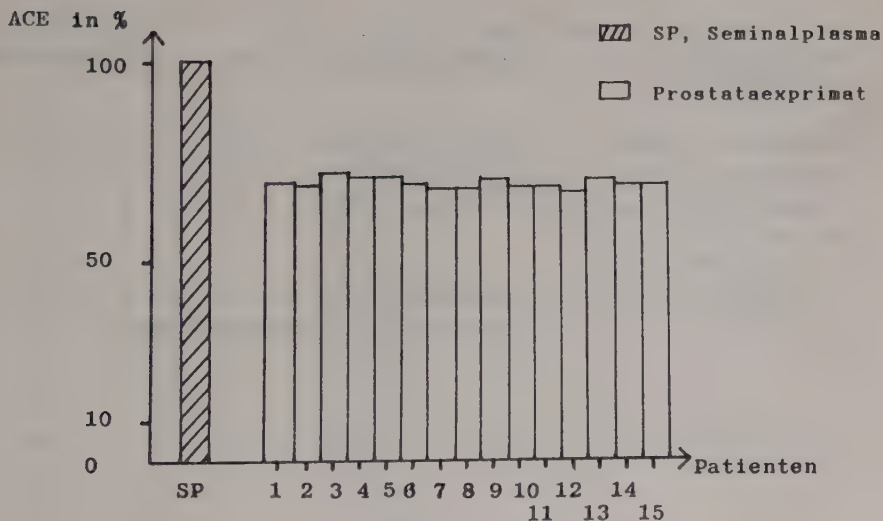


ABB. 28: DARSTELLUNG DES PROZENTUALEN ANTEILS DER ACE-AKTIVITÄT IM PROSTATAEXPRIMAT ZUR ACE-AKTIVITÄT IM SEMINALPLASMA
(= 100 %) BEI NORMOZOOSPERMIE:



Statistische Analyse:

Prostataexprimat:

Mittelwert = $1,489 \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$

Standardabweichung (s) $\sigma_{n-1} = 0,0383$

Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) $\sigma = 0,0099$

Varianz (s^2) = $0,00147$

Variationskoeffizient VK = $2,57 \%$

Konfidenzintervall: $\mu = (1,489 \pm 0,019) \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$

mit $(1 - \alpha) = 95 \%$

μ = Mittelwert der Grundgesamtheit

Seminalplasma (vgl. 5.2.1.):

Mittelwert = $2,152 \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$

Nach dem t-Test für unabhängige Stichproben ergibt sich ein t von 5,023. Der Tabellenwert t_0 für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ und $f = n_1 + n_2 - 2 = 43$ Freiheitsgrade liegt bei 2,02. Da t größer als der Tabellenwert t_0 ist, wird die Nullhypothese H_0 mit der entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% verworfen. Somit besteht ein signifikanter Unterschied der ACE-Aktivitäten von Seminalplasma und Prostataexprimat bei Normozoospermie.

Der prozentuale Anteil der ACE-Aktivität im Prostataexprimat zur ACE-Aktivität im Seminalplasma ist folgendermaßen charakterisiert:

Mittelwert = $69,19 \%$

Standardabweichung (s) $\sigma_{n-1} = 1,825$

Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) $\sigma = 0,471$

Varianz (s^2) = $3,331$

Variationskoeffizient VK = $2,64 \%$

Konfidenzintervall: $\mu = (69,19 \pm 0,924) \% \text{ mit } (1 - \alpha) = 95 \%$

μ = Mittelwert der Grundgesamtheit

5.2.4. "GEWASCHENE SPERMATOZOEN"

In Zusammenarbeit mit anderen zur Zeit laufenden Untersuchungen wurden Suspensionen "gewaschener" Spermatozoen von 10 Patienten auf eine etwaige ACE-Aktivität untersucht. Zur Quantifizierung der ACE-Aktivität pro Anzahl Spermatozoen/ml erfolgte zusätzlich eine Auszählung der Spermatozoen.

Die Ergebnisse sind in den Abb. 29 bis 31 zusammengefaßt.

ABB. 29: ACE-AKTIVITÄT IN "GEWASCHENEN" SPERMATOZOEN:

Patient	Spermatozoen (Mill./ml)	ACE ($\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$)
1	104,5	0,132
2	125,0	0,170
3	112,5	0,150
4	131,2	0,158
5	87,5	0,113
6	93,7	0,109
7	125,0	0,163
8	106,2	0,121
9	100,0	0,126
10	143,7	0,176

ABB. 30 : ACE-AKTIVITÄT BEZOGEN AUF 100 MILL. SPERMATOZOEN/ML:

Patient	ACE ($\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$) Spermatozoen (100 Mill./ml)	Differenz vom Mittelwert
1	0,126	+0,001
2	0,136	+0,011
3	0,134	+0,009
4	0,120	-0,005
5	0,129	+0,004
6	0,116	-0,009
7	0,130	+0,005
8	0,114	-0,011
9	0,126	+0,001
10	0,122	-0,003

Statistische Analyse:

Mittelwert = $0,125 \mu\text{mol/ml} \times \text{min}/100 \text{ Mill./ml}$

Standardabweichung (s) $\sigma_{n-1} = 0,0218$

Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) $\sigma = 0,0069$

Varianz (s^2) = $0,00047$

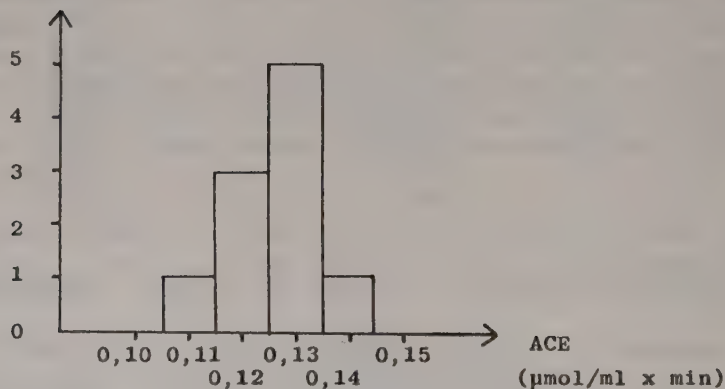
Variationskoeffizient VK = $17,41 \%$

Konfidenzintervall: $\mu = (0,125 \pm 0,0135) \mu\text{mol/ml} \times \text{min}/100 \text{ Mill./ml}$
mit $(1 - \alpha) = 95 \%$

μ = Mittelwert der Grundgesamtheit

ABB. 31: ACE-AKTIVITÄT BEZOGEN AUF 100 MILL. SPERMATOZOEN/ML:
(HISTOGRAMM)

Anzahl der
Patienten



5.2.5. BLUTSERUM

Als vergleichende Untersuchung zum androgenitalen System wurden Seren von 15 männlichen und 15 weiblichen Patienten auf ihre ACE-Aktivität untersucht.

Die Ergebnisse sind in den Abb. 32 bis 35 zusammengefaßt.

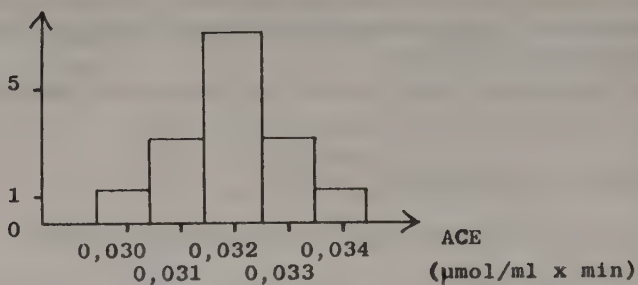
Männliches Kollektiv:

ABB. 32: ACE-AKTIVITÄT IM BLUTSERUM VON MÄNNERN:

Patient	ACE ($\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$)	Differenz vom Mittelwert
1	0,0325	+0,0007
2	0,0318	0
3	0,0335	+0,0017
4	0,0314	-0,0004
5	0,0320	+0,0002
6	0,0323	+0,0005
7	0,0302	-0,0016
8	0,0311	-0,0007
9	0,0319	+0,0001
10	0,0327	+0,0009
11	0,0307	-0,0011
12	0,0315	-0,0003
13	0,0333	+0,0015
14	0,0319	+0,0001
15	0,0321	+0,0003
Mittelwert	0,0318	

ABB. 33: ACE-AKTIVITÄT IM BLUTSERUM VON MÄNNERN (HISTOGRAMM):

Anzahl der
Patienten

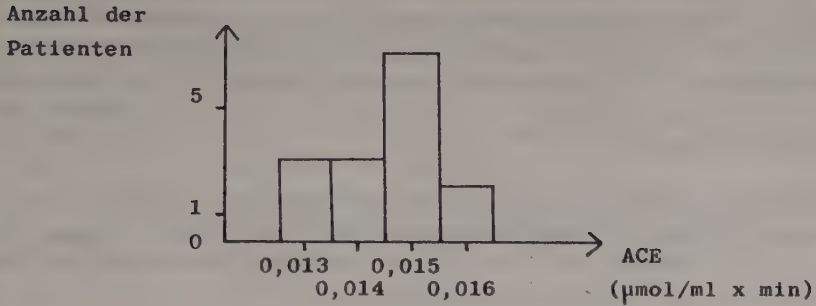


Weibliches Kollektiv:

ABB. 34: ACE-AKTIVITÄT IM BLUTSERUM VON FRAUEN:

Patient	ACE (μmol/ml x min)	Differenz vom Mittelwert
1	0,0141	-0,0005
2	0,0128	-0,0018
3	0,0140	-0,0006
4	0,0138	-0,0008
5	0,0146	0
6	0,0148	+0,0002
7	0,0149	+0,0003
8	0,0144	-0,0002
9	0,0148	+0,0002
10	0,0146	0
11	0,0159	+0,0013
12	0,0150	+0,0004
13	0,0153	+0,0007
14	0,0162	+0,0016
15	0,0132	-0,0014
Mittelwert	0,0146	

ABB. 35 : ACE-AKTIVITÄT IM BLUTSERUM VON FRAUEN (HISTOGRAMM):



Statistische Analyse:

Männliches Kollektiv:

Mittelwert = $0,0318 \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$

Standardabweichung (s) $\sigma_{n-1} = 0,00305$

Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) $\sigma = 0,000787$

Varianz (s^2) = $0,0000093$

Variationskoeffizient VK = $9,57 \%$

Konfidenzintervall: $\mu = (0,0318 \pm 0,0015) \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$
mit $(1 - \alpha) = 95 \%$

Weibliches Kollektiv:

Mittelwert = $0,0146 \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$

Standardabweichung (s) $\sigma_{n-1} = 0,00339$

Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) $\sigma = 0,000877$

Varianz (s^2) = $0,0000115$

Variationskoeffizient VK = $23,26 \%$

Konfidenzintervall: $\mu = (0,0146 \pm 0,0017) \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$
mit $(1 - \alpha) = 95 \%$

μ = Mittelwert der Grundgesamtheit

Nach dem t-Test für unabhängige Stichproben ergibt sich ein t von 18,25. Der Tabellenwert t_0 für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ und $f = n_1 + n_2 - 2 = 28$ Freiheitsgrade liegt bei 2,04. Da t größer als der Tabellenwert t_0 ist, wird die Nullhypothese H_0 mit der entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % verworfen. Somit besteht ein signifikanter Unterschied der ACE-Aktivitäten im Blutserum von Männern und der ACE-Aktivitäten im Blutserum von Frauen, d.h. bei Männern ist der ACE-Gehalt im Blutserum höher.

Vergleicht man diese Werte mit der mittleren ACE-Aktivität im Seminalplasma bei Normozoospermie (Abb. 22), so stellt man fest, daß im Seminalplasma die ACE-Aktivität das 68-fache der ACE-Aktivität der Blutseren von Männern bzw. das 147-fache der ACE-Aktivität der Blutseren von Frauen beträgt.

5.3. BESTIMMUNG DER ACE-AKTIVITÄT IN ISOLIERTEN MEMBRANVESIKELN

Durch zwei verschiedene Zentrifugationsverfahren an einem Seminalplasmapool von Patienten der Andrologischen Ambulanz wurden Membranvesikel isoliert. In den jeweiligen Überständen und resuspendierten Sedimenten wurde eine ACE-Aktivitätsbestimmung durchgeführt.

Als Basiswert wurde vorher eine ACE-Bestimmung des gepoolten 1:10 verdünnten Seminalplasmas durchgeführt.

Alle durchgeführten Messungen wurden jeweils fünfmal wiederholt um ein statistisch repräsentatives Ergebnis zu erhalten.

Die Ergebnisse sind in den Abb. 36 bis 38 zusammengefaßt.

ABB. 36 : ACE-AKTIVITÄT BEI UNTERSCHIEDLICHER ZENTRIFUGATION EINES SEMINALPLASMAPOOLS:

Probe (n = 5)	ACE ($\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$)				
Seminalplasmapool	2,41	2,37	2,35	2,39	2,35
Zentrifugation bei 50000 x g, 90 min, 4° C					
Überstand	2,29	2,21	2,23	2,20	2,23
Sediment	0,14	0,11	0,17	0,15	0,14
Zentrifugation bei 106000 x g, 11 h, 4° C					
Überstand	0,88	0,92	0,85	0,89	0,88
Sediment	1,49	1,53	1,47	1,45	1,50

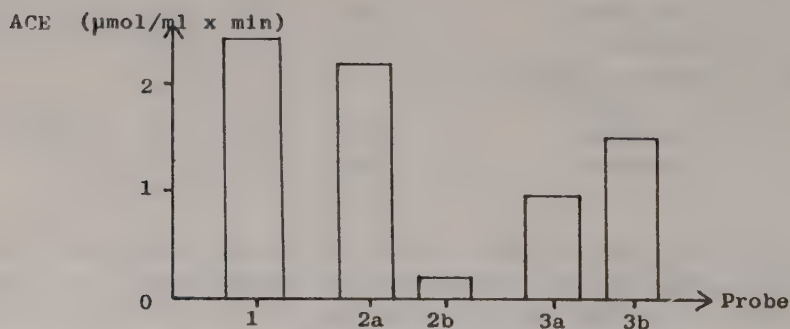
Nach dem Link-Wallace-Test ergibt sich ein K von 33,86. Der Tabellenwert K_0 für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$, $n = 5$ und $k = 3$ liegt bei 1,19. Da K größer als der Tabellenwert K_0 ist, wird die Nullhypothese H_0 mit der entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % verworfen. Nach Berechnung der Prüfgröße $\hat{D}_{0\hat{\alpha}}$ ($= 0,05$) sowie der Differenzen der einzelnen Mittelwerte $\hat{D}_i$ und deren Vergleich miteinander ergibt sich folgende Schlußfolgerung:

Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % besteht zwischen allen drei überprüften Stichproben ein signifikanter Unterschied.

ABB. 37: STATISTISCHE ANALYSE:

	Zentrifugation				
	Seminal- plasma	Über- stand	50000 x g Sediment	106000 x g Über- stand	Sediment
Mittelwert	2,374	2,232	0,142	0,884	1,488
Standardabweichung (s) σ_{n-1}	0,0522	0,0699	0,0434	0,0502	0,0605
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ	0,0233	0,0312	0,0194	0,0224	0,0270
Varianz (s^2)	0,0027	0,0049	0,0019	0,0025	0,0037
Variationskoeffizient	2,19 %	3,13 %	30,53%	5,68 %	4,06 %
Konfidenzintervall (1 - α) = 95 %	$\pm 0,046$	$\pm 0,061$	$\pm 0,038$	$\pm 0,044$	$\pm 0,053$

ABB. 38 : GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER ACE-AKTIVITÄT BEI UNTERSCHIEDLICHER ZENTRIFUGATION EINES SEMINALPLASMA-POOLS:



1 = Seminalplasmapool

2 = Zentrifugation bei 50000 x g, 90 min, 4° C
a = Überstand, b = Sediment

3 = Zentrifugation bei 106000 x g, 11 h, 4° C
a = Überstand, b = Sediment

Während bei der Zentrifugation des Seminalplasmapools bei 50000 x g, 90 min, 4⁰ C im Überstand noch 94 % der ACE-Aktivität des Seminalplasmapools nachzuweisen sind, befinden sich bei einer Zentrifugation bei 106000 x g 11 h, 4⁰ C nur noch 37 % der ACE-Aktivität des Pools im Überstand. Somit bleiben bei der Isolierung von Membranvesikeln aus Seminalplasma durch Zentrifugation bei 106000 x g 63 % der insgesamt vorkommenden ACE-Aktivität im Sediment, d.h. sind an Membranvesikel gebunden. Bei den Experimenten konnte beobachtet werden, daß die Bindung der ACE-Aktivität an makromolekulare Strukturen in gewisser Weise ein Maß für die Nativität, oder vielleicht auch für das Vorhandensein von Pathomechanismen, darstellt.

Die Ultrazentrifugation bei 106000 x g, 11 h, 4⁰ C wurde in den folgenden Untersuchungen zur Isolierung von Membranvesikeln verwendet.

5.4. GELCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR VERTEILUNG DER ACE-AKTIVITÄT IM SEMINALPLASMA

5.4.1. GELFILTRATION VON MEMBRANVESIKELN

5.4.1.1. ISOLIERTE MEMBRANVESIKEL

Isolierte Membranvesikel wurden mit Sepharose 6B als stationäre Phase gelfiltriert. Anschließend wurde die ACE-Aktivität im Säuleneluat bestimmt. Gleichzeitig wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in den Abb. 39 und 40 zusammengefaßt.

Abb. 39 zeigt das Elutionsdiagramm der isolierten Membranvesikel, die als scharf begrenzter hoher Peak zu Beginn der Elution erscheinen.

Hinsichtlich der ACE-Aktivitätsverteilung im Eluat konnte gezeigt werden, daß fast das gesamte ACE eine Beziehung zu diesem hohen Peak des Elutionsdiagramms, der die Membranvesikel repräsentiert, zeigt (Abb. 39). Betrachtet man die spezifische Aktivität des ACE im Eluat, so wird dieses Ergebnis nur bestätigt (Abb. 40). Es muß allerdings auch angenommen werden, daß die Proteinbestimmung nach Lowry nicht das gesamte Protein der Membranvesikel erfaßt (Abb. 39).

ABB. 39: GELCHROMATOGRAPHIE VON MEMBRANVESIKELN AUS HUMANEM SEMINALPLASMA NACH SEDIMENTATION IN DER ULTRAZENTRIFUGE (106000 X g):

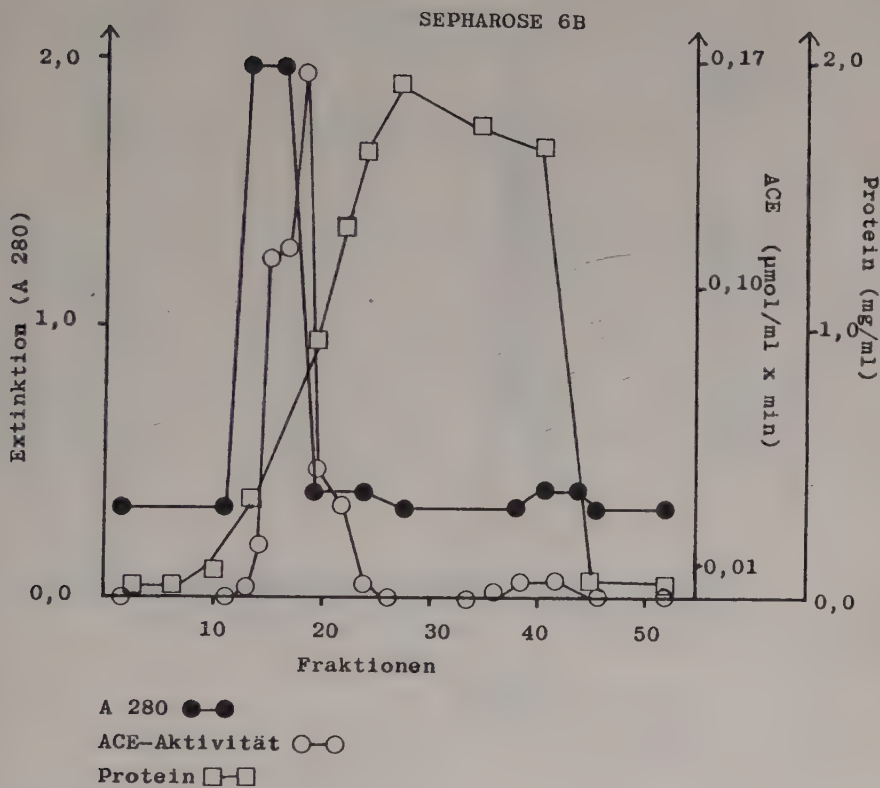
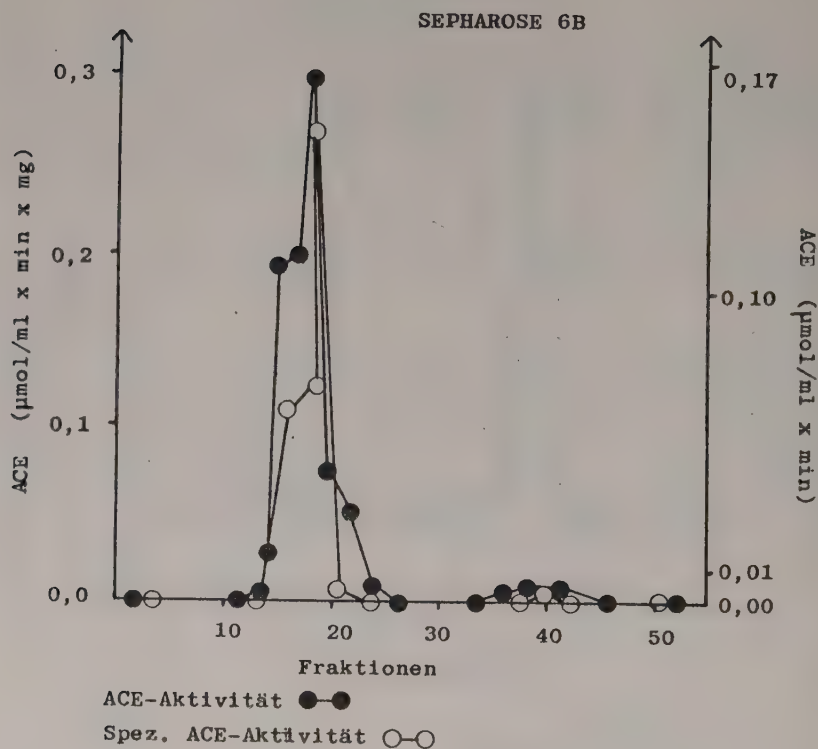


ABB. 40: GELCHROMATOGRAPHIE VON MEMBRANVESIKELN AUS HUMANEM SEMINALPLASMA - VERTEILUNG DER ACE-AKTIVITÄT:



5.4.1.2. GELCHROMATOGRAPHIE VON MEMBRANVESIKELN NACH GEFRIERSCHOCKBEHANDLUNG

Isolierte Membranvesikel wurden mit Membranvesikeln nach Gefrierschockbehandlung verglichen. Dazu wurde ein Teil der unbehandelten Membranvesikel gelfiltriert und danach einer ACE- und Proteinbestimmung zugeführt. Der andere Teil der Membranvesikel wurde nach Gefrierschock gelfiltriert und das in den einzelnen Fraktionen enthaltene ACE und Protein bestimmt.

Zur Auswertung der Gelchromatographie der unbehandelten Membranvesikel sei auf 5.4.1.1. verwiesen.

Bei den Membranvesikeln nach Gefrierschockbehandlung wurde die in den Abb. 41 und 42 aufgezeigte Verteilung der ACE-Aktivität nach Gelfiltration erzielt.

Es zeigte sich, daß sowohl das Elutionsdiagramm (Abb. 41), als auch die untersuchten Parameter, d.h. die ACE-Aktivitätsverteilung im Eluat sowie der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu entsprechenden Verteilung unbehandelter Membranvesikel aufwies (Abb. 41, 42).

ABB. 41 : GELCHROMATOGRAPHIE VON MEMBRANVESIKELN AUS HUMANEM SEMINALPLASMA NACH GEFRIERSCHOCK-BEHANDLUNG:

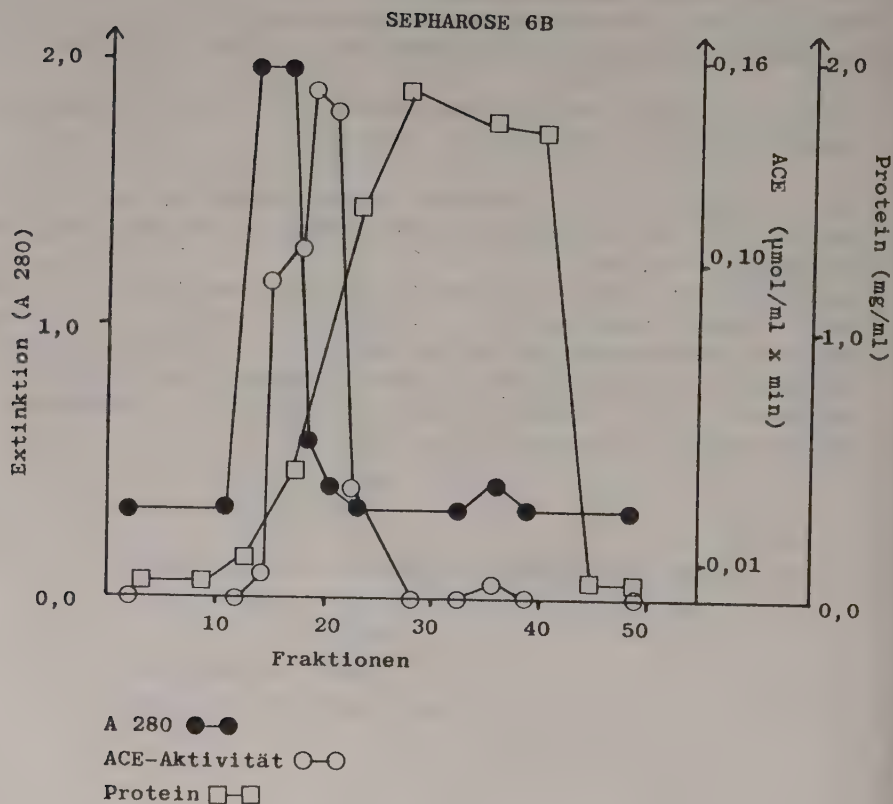
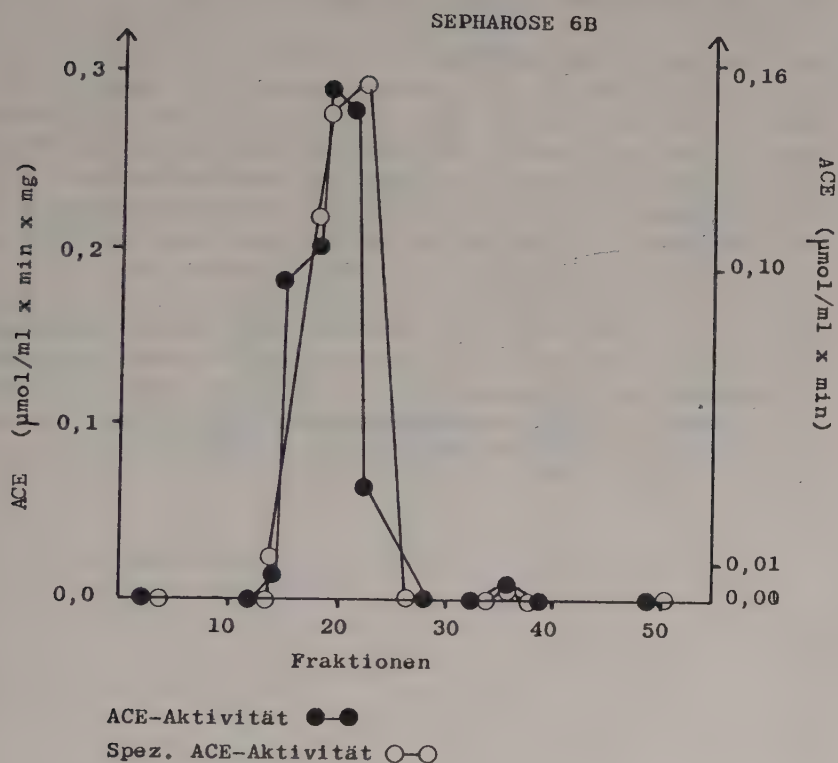


ABB. 42: GELCHROMATOGRAPHIE VON MEMBRANVESIKELN AUS HUMANEM SEMINALPLASMA NACH GEFRIERSCHOCK-BEHANDLUNG
VERTEILUNG DER ACE-AKTIVITÄT:



5.4.1.3. SOLUBILISIERTE MEMBRANVESIKEL

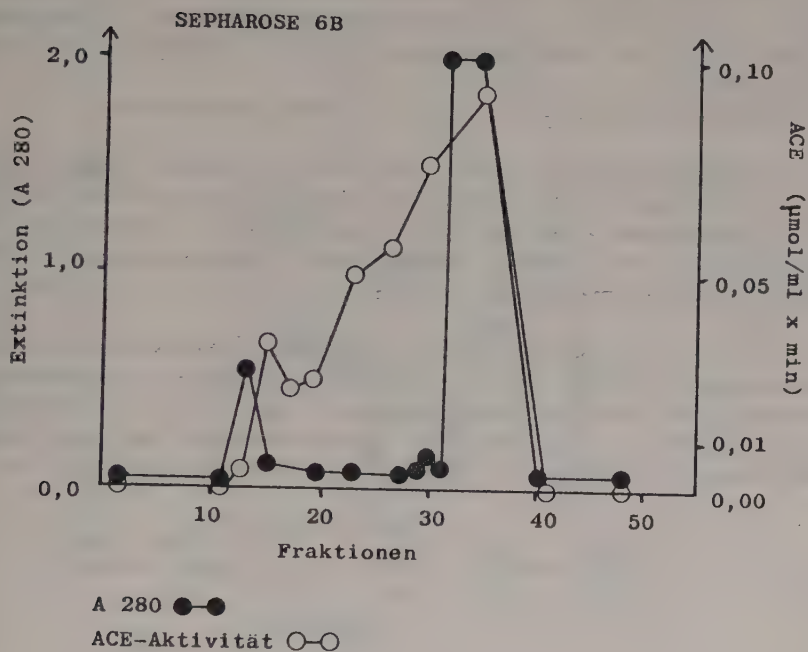
Solubilisierete Membranvesikel wurden mit Sepharose 6B als stationäre Phase gelfiltriert. Anschließend wurde die ACE-Aktivität im Säuleneluat bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Abb. 43 dargestellt.

Im Gegensatz zu den unbehandelten Membranvesikeln (Abb. 39) ist nach Solubilisierung der Membranvesikel der Hauptanteil des Eluates, der sich bei den nativen Vesikeln in Form eines einzigen hohen Peaks zu Beginn der Elution darstellt, hier nicht nachzuweisen. Vielmehr erhält man ein Elutionsdiagramm, bei dem sich zu Beginn der Elution zwar ein kleiner Peak nachweisen läßt, der Hauptanteil wird jedoch erst in Fraktionen mit kleinerem Massengewicht in Form eines hohen Peaks eluiert (Abb. 43).

Hinsichtlich der ACE-Aktivitätsverteilung im Elutionsdiagramm konnte festgestellt werden, daß sich das ACE mehr oder weniger gleichmäßig über die gesamte Elution verteilt, jedoch steigende Aktivitäten in späteren Fraktionen, d.h. bei kleineren Massengewichten aufweist (Abb. 43).

ABB. 43: GELCHROMATOGRAPHIE VON SOLUBILISIERTEN MEMBRANVESIKELN
VERTEILUNG DER ACE-AKTIVITÄT:



5.4.2. GELFILTRATION VON SEMINALPLASMA

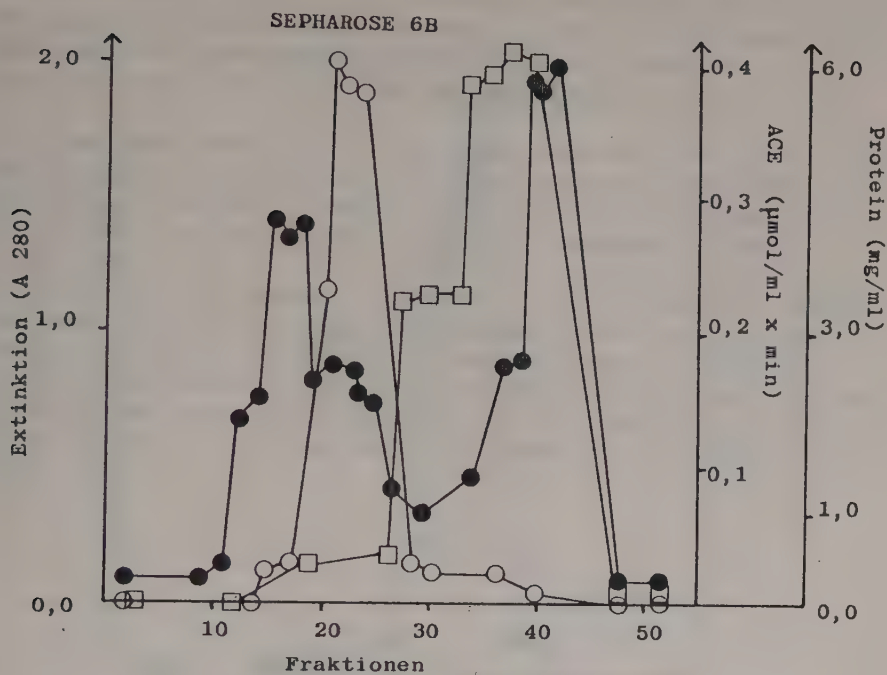
Seminalplasma von 10 Patienten der Andrologischen Ambulanz wurde mit Sepharose 6B als stationäre Phase gelfiltriert. Anschließend wurde die ACE-Aktivität im Säuleneluat bestimmt. Gleichzeitig wurde auch eine Proteinbestimmung in den einzelnen Fraktionen durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in den Abb. 44 und 45 dargestellt.

Das Elutionsdiagramm (Abb. 44) zeigte zwei mehr oder weniger scharf begrenzte hohe Peaks, wobei der erste Peak dem Peak des Elutionsdiagramms der isolierten Membranvesikel (siehe Abb. 39) entsprach. In jedem untersuchten Seminalplasma konnten Membranvesikel nachgewiesen werden.

Hinsichtlich der ACE-Aktivitätsverteilung im Seminalplasma konnte festgestellt werden, daß ein Großteil des ACE eine Beziehung zum ersten Peak des Elutionsdiagramms, der die Membranvesikel repräsentiert, zeigt (Abb. 44). Bei Betrachtung der spezifischen Aktivitäten von ACE wurde dieses Ergebnis bestätigt (Abb. 45).

ABB. 44: GELCHROMATOGRAPHIE VON HUMANEM SEMINALPLASMA
VERTEILUNG DER ACE-AKTIVITÄT:

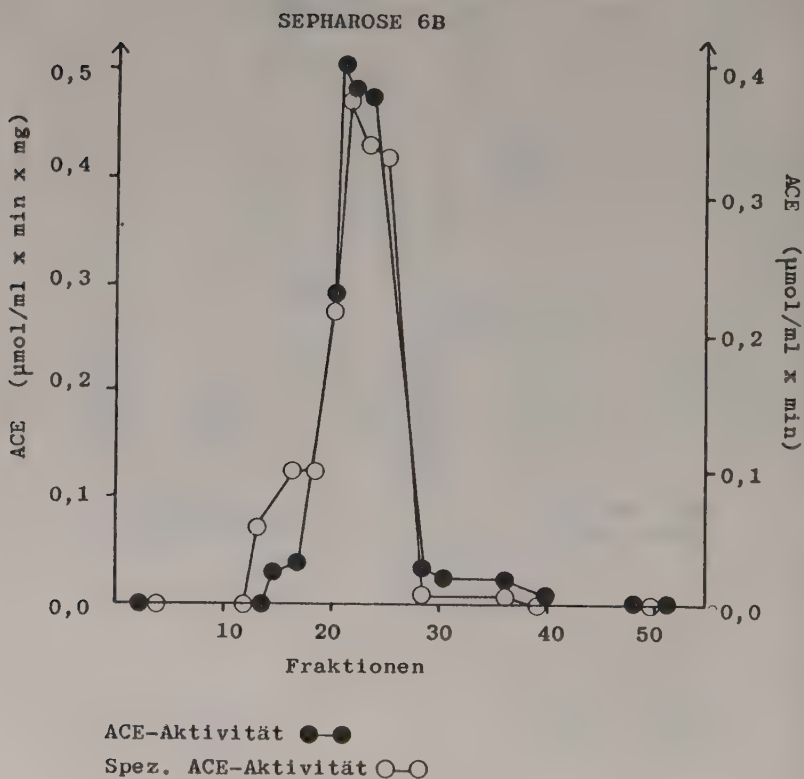


A 280 ●—●

ACE-Aktivität ○—○

Protein □—□

ABB. 45: GELCHROMATOGRAPHIE VON HUMANEM SEMINALPLASMA
VERTEILUNG DER ACE-AKTIVITÄT:



5.4.3. GELFILTRATION VON PROSTATAEEXPRIMATEN

Prostataexprime von 5 Patienten der Urologischen Abteilung der Landeskrankenanstalten Salzburg/Österreich wurden mit Sepharose 6B als stationäre Phase gelfiltriert. Anschließend wurde eine ACE- und Proteinbestimmung im Säuleneluat durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abb. 46 und 47 dargestellt.

Das Elutionsdiagramm (Abb. 46) zeigte eine deutliche Ähnlichkeit zum Elutionsverhalten isolierter Membranvesikel (siehe Abb. 39). Zu Beginn der Elution konnte ein scharf begrenzter hoher Peak, der die Membranvesikel repräsentiert, nachgewiesen werden.

Hinsichtlich der ACE-Aktivitätsverteilung im Prostataexprimat wurden die selben Ergebnisse wie bei den Verteilungen des ACE im Seminalplasma und der Elution von Membranvesikeln erzielt. Ein Großteil des ACE zeigte eine Beziehung zu dem hohen Peak der Elution von Prostataexprimat (Abb. 46). Die Verteilung der spezifischen Aktivitäten von ACE bestätigten dieses Ergebnis (Abb. 47).

ABB. 46: GELCHROMATOGRAPHIE VON HUMANEM PROSTATAEKSPRIMAT
VERTEILUNG DER ACE-AKTIVITÄT:

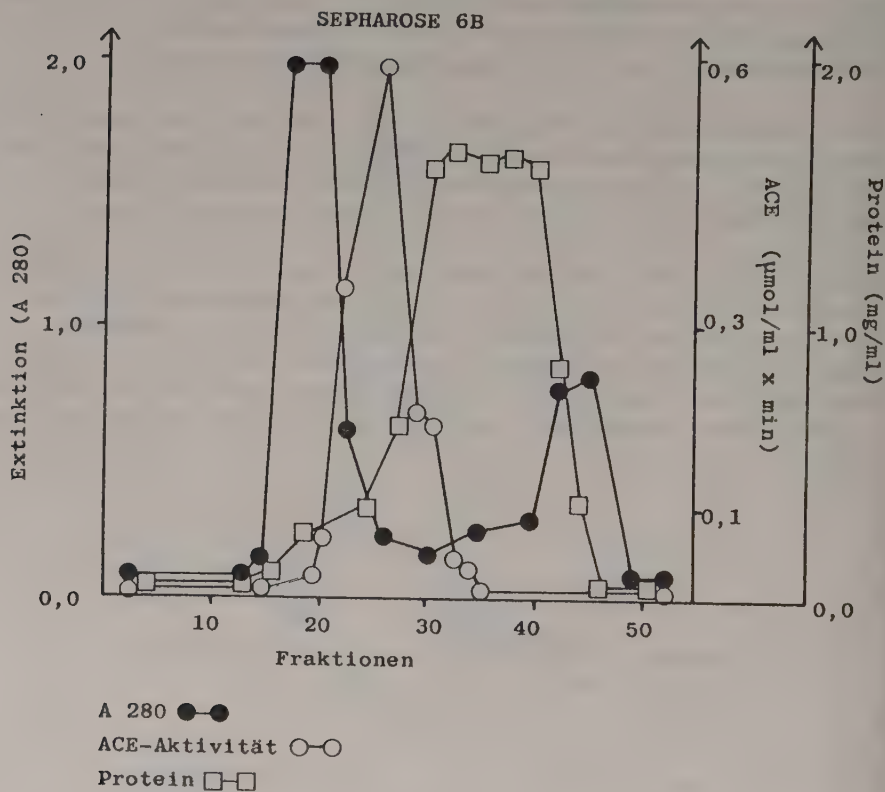
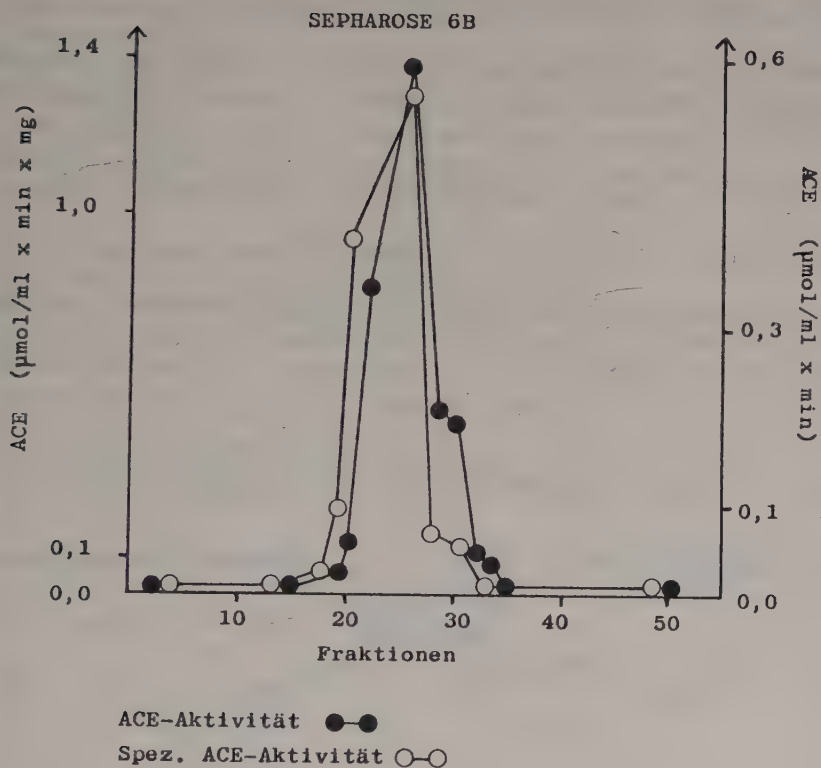


ABB. 47: GELCHROMATOGRAPHIE VON HUMANEM PROSTATAEKSPRIMAT
VERTEILUNG DER ACE-AKTIVITÄT:



5.5. VERGLEICH DER EIGENSCHAFTEN DES ANGIOTENSIN-CONVERTING-ENZYME IN SEMINALPLASMA UND BLUTSERUM

5.5.1. TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DER ACE-AKTIVITÄT

Gepooltes Seminalplasma und gepooltes Serum wurde bei folgenden Inkubationstemperaturen auf seine jeweilige ACE-Aktivität untersucht:

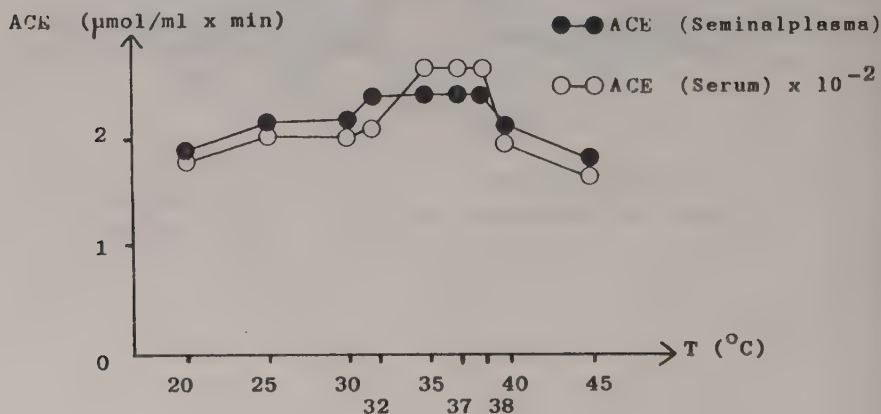
20° C, 25° C, 30° C, 32° C, 35° C, 37° C, 38° C, 40° C, 45° C

Die Ergebnisse sind in Abb. 48 dargestellt.

Im Seminalplasma ließ sich ein Temperaturoptimum der ACE-Aktivität von 32° C bis 38° C feststellen.

Die optimale Temperatur der ACE-Aktivität im Serum lag zwischen 35° C und 38° C.

ABB. 48: TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DER ACE-AKTIVITÄT:



5.5.2. EINFLUSS VERSCHIEDENER SUBSTRATKONZENTRATIONEN AUF DIE ACE-AKTIVITÄT

Die ACE-Bestimmung wurde jeweils fünfmal mit verschiedenen Substratkonzentrationen in gepooltem Seminalplasma und Serum durchgeführt.

Es zeigte sich sowohl beim Seminalplasma als auch beim Serum, daß die ACE-Aktivität mit zunehmender Substratkonzentration bis 5 mmol/l anstieg. Bei höheren Konzentrationen nahm die Aktivität wieder ab, was auf eine Substrathemmung hindeutet.

Die Lineweaver-Burk-Diagramme (Abb. 49) repräsentieren jeweils die Mittelwerte der fünfmaligen Messungen.

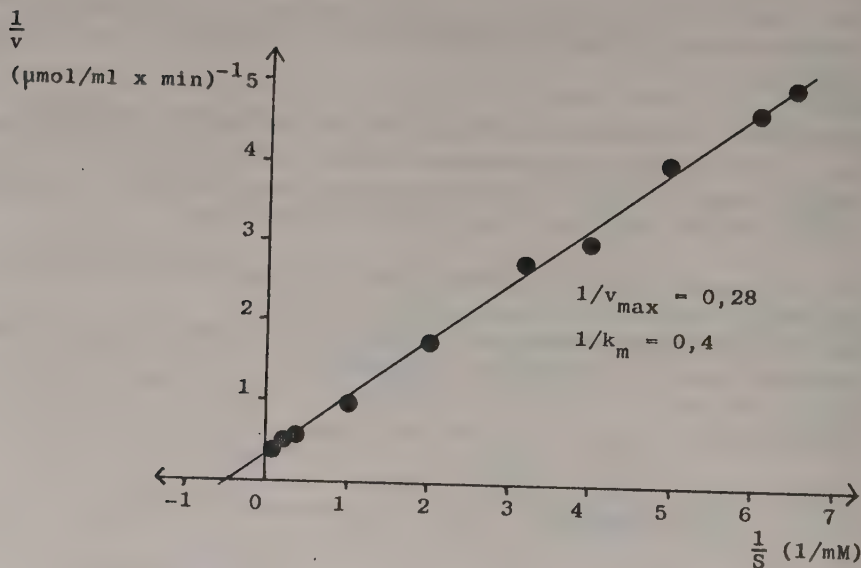
Durch graphische Bestimmung ergaben sich für das Seminalplasma und das Serum folgende mittlere Ergebnisse.

Seminalplasma: $v_{\max} = 3,57 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$
 $k_m = 2,5 \text{ mmol/l}$

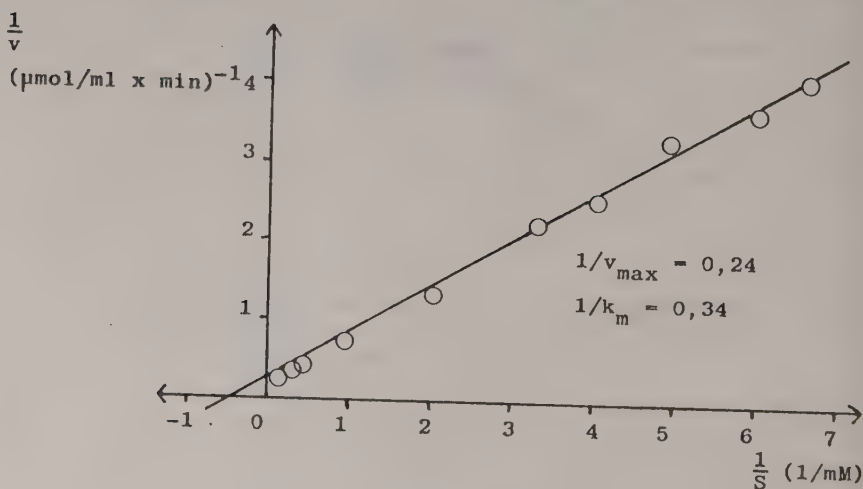
Serum: $v_{\max} = 4,17 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$
 $k_m = 2,94 \text{ mmol/l}$

ABB. 49: EINFLUSS DER SUBSTRATKONZENTRATION AUF DIE ACE-AKTIVITÄT
LINEWEAVER-BURK-DIAGRAMM:

a: Seminalplasma



b: Serum



Statistische Analyse:

Seminalplasma:

	<u>v_{max}</u>	<u>k_m</u>
Mittelwert:	3,57	2,5
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,045	0,32
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,02	0,14
Varianz (s ²):	0,0020	0,102
Variationskoeffizient VK:	1,26 %	12,8 %
Konfidenzintervall mit $(1 - \alpha) = 95 \%$:	3,57 $\pm$ 0,039	2,5 $\pm$ 0,28
Einheit:	$\mu\text{mol/mlxmin}$	mmol/l

Serum

	<u>v_{max}</u>	<u>k_m</u>
Mittelwert:	4,17	2,94
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,051	0,102
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,023	0,046
Varianz (s ²):	0,0026	0,0104
Variationskoeffizient VK:	1,22 %	3,47 %
Konfidenzintervall mit $(1 - \alpha) = 95 \%$:	4,17 $\pm$ 0,045	2,94 $\pm$ 0,089
Einheit:	$\mu\text{mol/mlxmin}$	mmol/l

Nach dem t-Test für unabhängige Stichproben ergibt sich für die k_m - Überprüfung ein t von 12,4. Der Tabellenwert t_0 für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ und $f = n_1 + n_2 - 2 = 8$ Freiheitsgrade liegt bei 2,31. Da t größer als der Tabellenwert t_0 ist, wird die Nullhypothese H_0 mit der entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % verworfen.

Somit besteht ein signifikanter Unterschied der Michaeliskonstante k_m im Seminalplasma und der k_m im Blutserum.

5.5.3. EINFLUSS VERSCHIEDENER INHIBITOREN AUF DIE ACE-AKTIVITÄT

Mit verschiedenen Inhibitoren wurden die katalytischen Eigenschaften von ACE im Seminalplasma und im Blutserum untersucht. Hierzu wurde gepooltes Seminalplasma mit Sepharose 6B als Gelmatrix gelfiltriert. Anschließend wurde eine ACE- und Proteinbestimmung im Säuleneluat durchgeführt. Die drei Fraktionen mit den höchsten spezifischen ACE-Aktivitäten (Fraktion 23, 24, 25) wurden gepoolt und für die Hemmversuche verwendet.

In dem verwendeten Pool lag nun eine 40-fache Anreicherung vor, so daß mögliche Störfaktoren weitgehend ausgeschlossen wurden.

Die Bestimmung der ACE-Aktivität im Serum wurde mit gepooltem Serum, erhalten von Männern und Frauen, durchgeführt, das ebenso gelfiltriert wurde. Es wurden somit unspezifische Peptidasen, die vor allem im Serum vorhanden sind, weitgehend ausgeschlossen.

5.5.3.1. BRADYKININ

Der hemmende Einfluß von Bradykinin auf die ACE-Aktivität wurde untersucht. Bei der Hemmung handelt es sich um eine Substrathemmung.

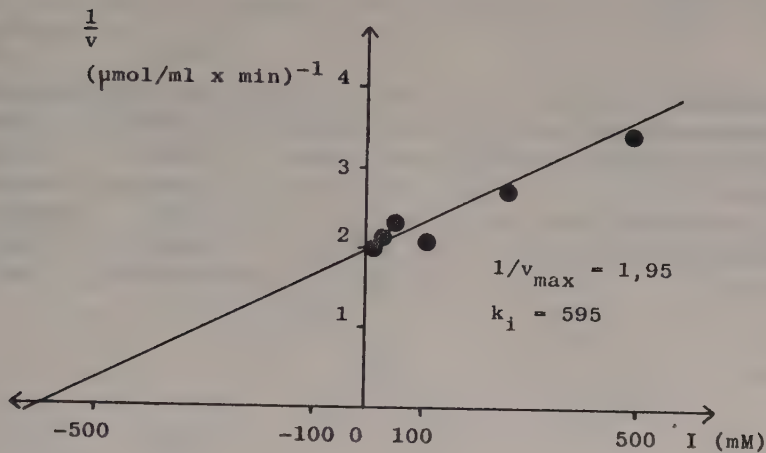
Die graphische Ermittlung der k_i aus dem Dixon-plot (Abb. 50) ergab für angereichertes ACE aus Seminalplasma und Serum folgende Werte:

$$\begin{aligned}\text{Seminalplasma: } v_{\max} &= 0,513 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times \text{min} \\ k_i &= 5,95 \times 10^{-1} \text{ mol/l}\end{aligned}$$

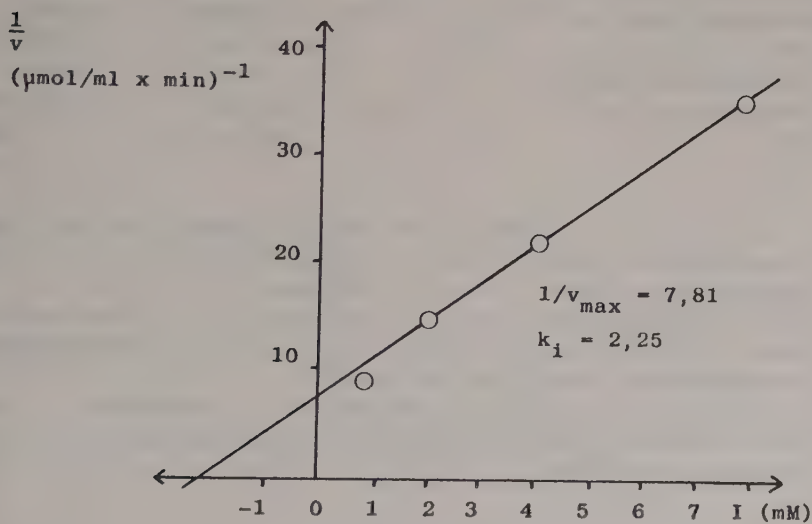
$$\begin{aligned}\text{Serum: } v_{\max} &= 0,128 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times \text{min} \\ k_i &= 2,25 \times 10^{-3} \text{ mol/l}\end{aligned}$$

ABB. 50 : HEMMUNG DER ACE-AKTIVITÄT MIT BRADYKININ
DIXON-PLOT:

a: Seminalplasma



b: Serum



Statistische Analyse:

Seminalplasma:

	<u>v_{max}</u>	<u>k₁</u>
Mittelwert:	0,513	5,95x10 ⁻¹
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,019	0,133
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,0084	0,059
Varianz (s ²):	0,00036	0,0177
Variationskoeffizient VK:	3,70 %	2,24 %
Konfidenzintervall mit (1 - α) = 95 %:	0,513±0,017	(5,95±0,12)
Einheit:	μmol/mlxmin	x 10 ⁻¹ mol/l

Serum:

	<u>v_{max}</u>	<u>k₁</u>
Mittelwert:	0,128	2,25x10 ⁻³
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,012	0,082
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,0052	0,0369
Varianz (s ²):	0,00014	0,0067
Variationskoeffizient VK:	9,38 %	3,64 %
Konfidenzintervall mit (1 - α) = 95 %:	0,128±0,011	(2,25±0,07)
Einheit:	μmol/mlxmin	x 10 ⁻³ mol/l

Nach dem t-Test für unabhängige Stichproben ergibt sich für die k₁ - Überprüfung ein t von 85. Der Tabellenwert t₀ für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ und f = n₁ + n₂ - 2 = 8 Freiheitsgrade liegt bei 2,31. Da t größer als der Tabellenwert t₀ ist, wird die Nullhypothese H₀ mit der entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % verworfen.

Somit besteht ein signifikanter Unterschied der Inhibitorkonstante k₁ von Bradykinin im Seminalplasma und der k₁ von Bradykinin im Serum.

5.5.3.2. KALLIDIN

Mit Kallidin als Inhibitor wurde ebenfalls eine Substrathemmung durchgeführt.

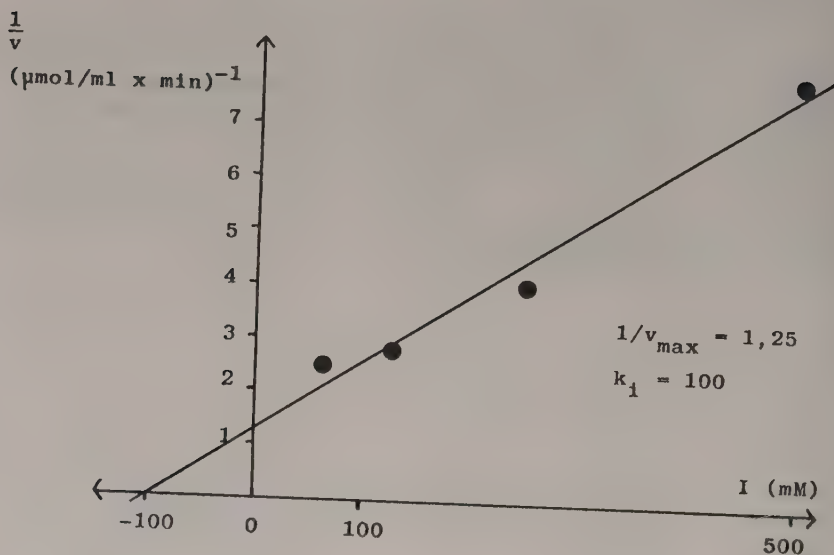
Die graphische Ermittlung aus dem Dixon-plot (Abb. 51) ergab für angereichertes ACE aus Seminalplasma und Serum folgende Werte:

Seminalplasma: $v_{\max} = 0,8 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$
 $k_i = 1,0 \times 10^{-1} \text{ mol/l}$

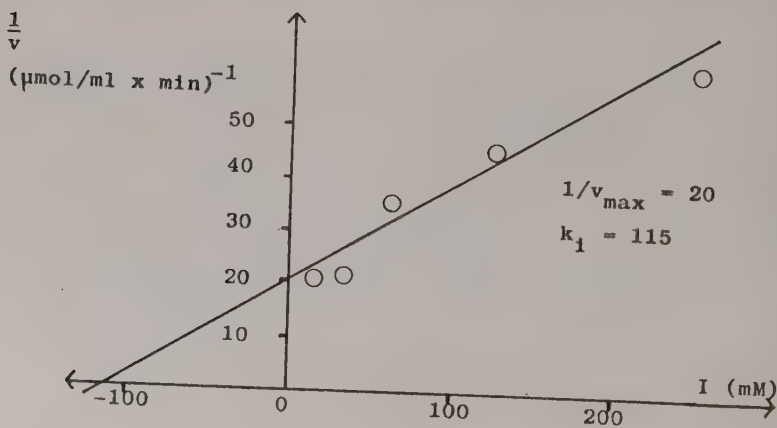
Serum: $v_{\max} = 0,05 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$
 $k_i = 1,15 \times 10^{-1} \text{ mol/l}$

ABB. 51: HEMMUNG DER ACE-AKTIVITÄT MIT KALLIDIN
DIXON-PLOT:

a: Seminalplasma



b: Serum



Statistische Analyse:

Seminalplasma:

	<u>v_{max}</u>	<u>k_i</u>
Mittelwert:	0,8	1,0x10 ⁻¹
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,158	0,232
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,07	0,104
Varianz (s ²):	0,025	0,054
Variationskoeffizient VK:	19,75 %	23,2 %
Konfidenzintervall mit (1 - α) = 95 %:	0,8 $\pm$ 0,14	(1,0 $\pm$ 0,20)
Einheit:	$\mu\text{mol/mlxmin}$	x10 ⁻¹ mol/l

Serum:

	<u>v_{max}</u>	<u>k'_i</u>
Mittelwert:	0,05	1,15x10 ⁻¹
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,0148	0,158
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,0066	0,071
Varianz (s ²):	0,00022	0,025
Variationskoeffizient VK:	29,6 %	13,74 %
Konfidenzintervall mit (1 - α) = 95 %:	0,05 $\pm$ 0,013	(1,15 $\pm$ 0,14)
Einheit:	$\mu\text{mol/mlxmin}$	x 10 ⁻¹ mol/l

Nach dem t-Test für unabhängige Stichproben ergibt sich für die k_i - Überprüfung ein t von 1,25. Der Tabellenwert t₀ für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ und f = n₁ + n₂ - 2 = 8 Freiheitsgrade liegt bei 2,31. Da t kleiner als der Tabellenwert t₀ ist, wird die Nullhypothese H₀ mit der entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % bestätigt.

Somit besteht kein signifikanter Unterschied der Inhibitorkonstante k_i von Kallidin im Seminalplasma und der k_i von Kallidin im Serum. Die k_i für Kallidin im Seminalplasma ist identisch der k_i für Kallidin im Serum.

5.5.3.3. METHIONYLKALLIDIN

Mit Methionylkallidin wurde ebenso wie mit den anderen Kininen die Hemmung der ACE-Aktivität untersucht.

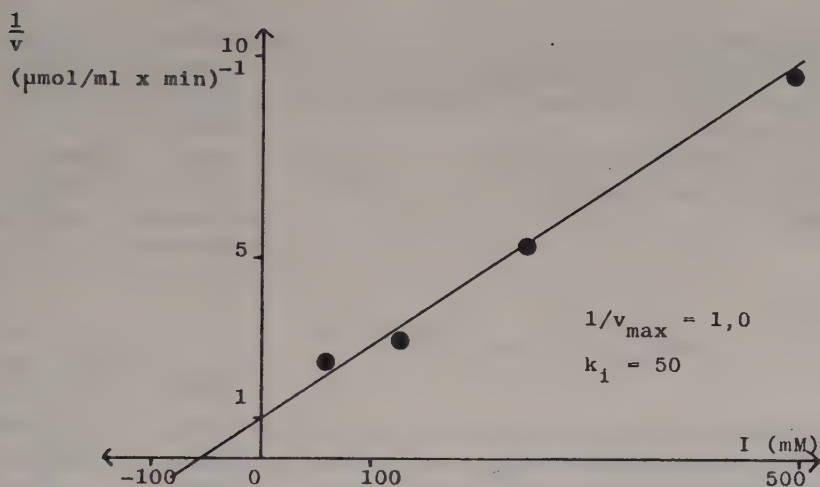
Die graphische Bestimmung aus dem Dixon-plot (Abb. 52) ergab für den angereicherten Seminalplasmampool und den Serumpool folgende Werte:

$$\begin{aligned}\text{Seminalplasma: } v_{\max} &= 1,0 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times \text{min} \\ k_i &= 5,0 \times 10^{-2} \text{ mol/l}\end{aligned}$$

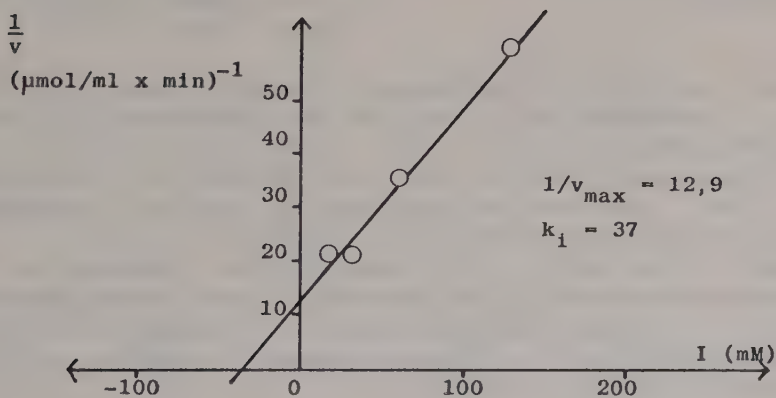
$$\begin{aligned}\text{Serum: } v_{\max} &= 0,077 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times \text{min} \\ k_i &= 3,7 \times 10^{-2} \text{ mol/l}\end{aligned}$$

ABB. 52: HEMMUNG DER ACE-AKTIVITÄT MIT METHIONYALKALLIDIN
DIXON-PLOT:

a: Seminalplasma



b: Serum



Statistische Analyse:

Seminalplasma:

	<u>v_{max}</u>	<u>k_i</u>
Mittelwert:	1,0	$5,0 \times 10^{-2}$
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,158	1,33
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,071	0,597
Varianz (s ²):	0,025	1,77
Variationskoeffizient VK:	15,8 %	26,6 %
Konfidenzintervall mit $(1 - \alpha) = 95 \%$:	$1,0 \pm 0,14$	$(5,0 \pm 1,17)$
Einheit:	$\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$	$\times 10^{-2} \text{ mol/l}$

Serum:

	<u>v_{max}</u>	<u>k_i</u>
Mittelwert:	0,077	$3,7 \times 10^{-2}$
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,011	0,165
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,0048	0,074
Varianz (s ²):	0,00012	0,027
Variationskoeffizient VK:	14,29 %	4,45 %
Konfidenzintervall mit $(1 - \alpha) = 95 \%$:	$0,077 \pm 0,009$	$(3,7 \pm 0,14)$
Einheit:	$\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$	$\times 10^{-2} \text{ mol/l}$

Nach dem t-Test für unabhängige Stichproben ergibt sich für die k_i - Überprüfung ein t von 2,16. Der Tabellenwert t_0 für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ und $f = n_1 + n_2 - 2 = 8$ Freiheitsgrade liegt bei 2,31. Da t kleiner als der Tabellenwert t_0 ist, wird die Nullhypothese H_0 mit der entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % bestätigt.

Somit besteht kein signifikanter Unterschied der Inhibitorkonstante k_i von Methionylkallidin im Seminalplasma und der k_i von Methionylkallidin im Serum. Die k_i für Methionylkallidin im Seminalplasma ist identisch der k_i für Methionylkallidin im Serum.

5.5.3.4. ANGIOTENSIN I

Mit Angiotensin I als Inhibitor wurde ein etwaiger Einfluß auf die ACE-Aktivität untersucht.

Sowohl Seminalplasma-ACE als auch Serum-ACE wird von Angiotensin I nicht gehemmt. Selbst bei einer Konzentration von 1 mol/l konnte keine Hemmung erzielt werden.

5.5.3.5. ANGIOTENSIN II

Mit Angiotensin II als Inhibitor wurde die Hemmung der ACE-Aktivität untersucht.

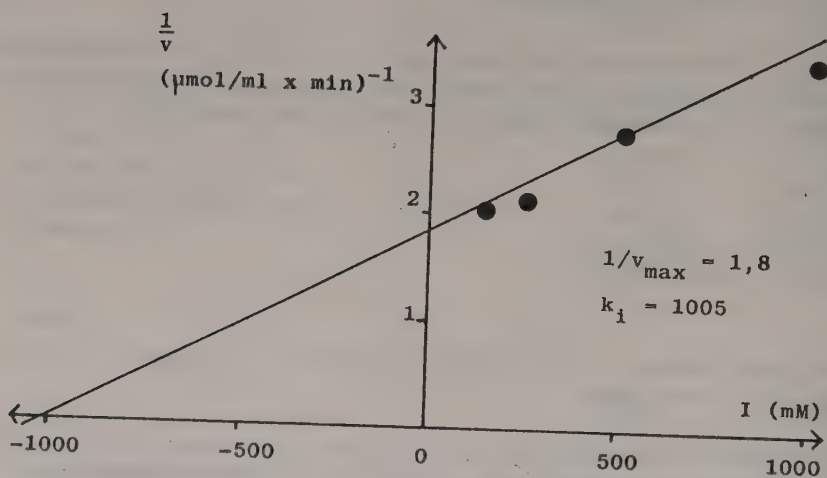
Die graphische Ermittlung aus dem Dixon-plot (Abb. 53) ergab für angereichertes ACE aus Seminalplasma und Serum folgende Werte:

Seminalplasma: $v_{\max} = 0,55 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$
 $k_i = 1,05 \text{ mol/l}$

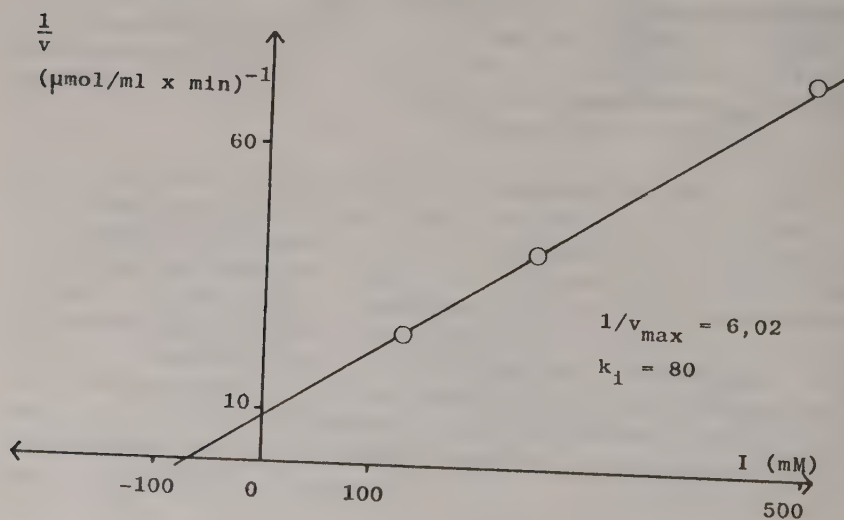
Serum: $v_{\max} = 0,166 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$
 $k_i = 8,0 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$

ABB. 53: HEMMUNG DER ACE-AKTIVITÄT MIT ANGIOTENSIN II
DIXON-PLOT:

a: Seminalplasma



b: Serum



Statistische Analyse:

Seminalplasma:

	<u>v_{max}</u>	<u>k₁</u>
Mittelwert:	0,55	1,05
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,082	0,076
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,037	0,034
Varianz (s ²):	0,0067	0,0058
Variationskoeffizient VK:	14,91 %	7,24 %
Konfidenzintervall mit (1 - α) = 95 %:	0,55 $\pm$ 0,07	1,05 $\pm$ 0,06
Einheit:	$\mu\text{mol/ml}\times\text{min}$	mol/l

Serum:

	<u>v_{max}</u>	<u>k₁</u>
Mittelwert:	0,166	8,0 $\times 10^{-2}$
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,010	0,76
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,0046	0,34
Varianz (s ²):	0,0001	0,578
Variationskoeffizient VK:	6,02 %	9,5 %
Konfidenzintervall mit (1 - α) = 95 %:	0,166 $\pm$ 0,009	(8,0 $\pm$ 0,67)
Einheit:	$\mu\text{mol/ml}\times\text{min}$	$\times 10^{-2}$ mol/l

Nach dem t-Test für unabhängige Stichproben ergibt sich für die k_1 - Überprüfung ein t von 2,84. Der Tabellenwert t_0 für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ und $f = n_1 + n_2 - 2 = 8$ Freiheitsgrade liegt bei 2,31. Da t größer als der Tabellenwert t_0 ist, wird die Nullhypothese H_0 mit der entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % verworfen.

Somit besteht ein signifikanter Unterschied der Inhibitorkonstante k_1 von Angiotensin II im Seminalplasma und der k_1 von Angiotensin II im Serum.

5.5.3.6. ANGIOTENSIN III

Der Einfluß von Angiotensin III auf die ACE-Aktivität wurde ebenfalls untersucht.

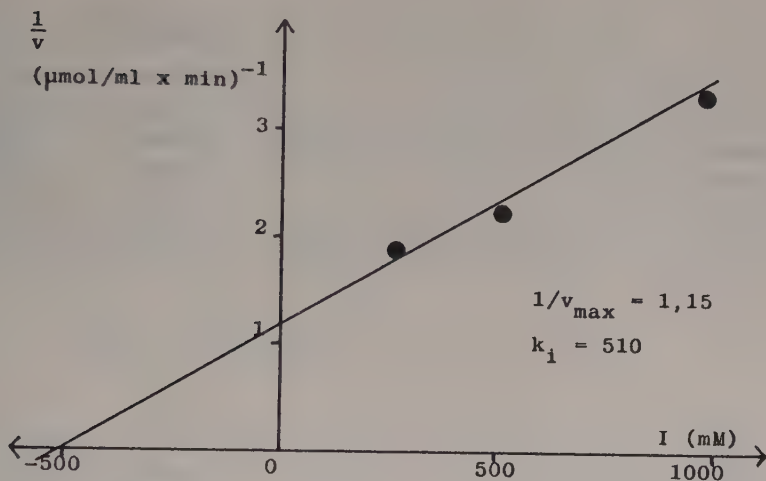
Die graphische Bestimmung aus dem Dixon-plot (Abb. 54) ergab für angereichertes ACE aus Seminalplasma und Serum folgende Werte:

Seminalplasma: $v_{\max} = 0,87 \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$
 $k_i = 5,1 \times 10^{-1} \text{ mol/l}$

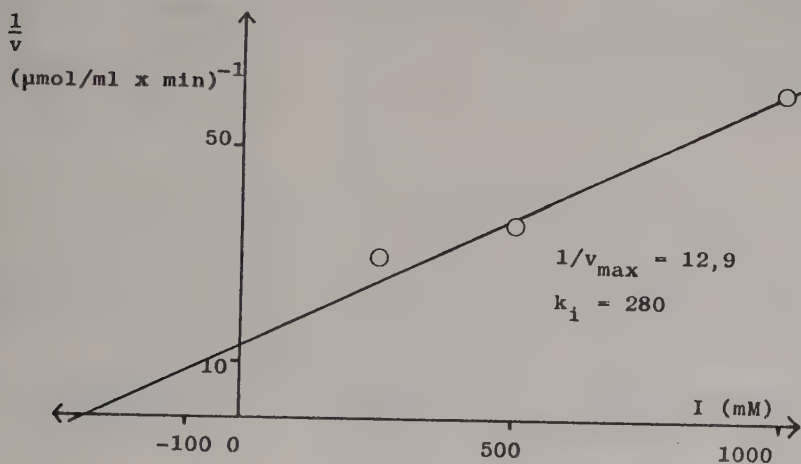
Serum: $v_{\max} = 0,077 \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$
 $k_i = 2,8 \times 10^{-1} \text{ mol/l}$

ABB. 54 : HEMMUNG DER ACE-AKTIVITÄT MIT ANGIOTENSIN III
DIXON-PLOT:

a: Seminalplasma



b: Serum



Statistische Analyse:

Seminalplasma:

	<u>v_{max}</u>	<u>k_i</u>
Mittelwert:	0,87	5,1x10 ⁻¹
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,108	0,158
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,048	0,071
Varianz (s ²):	0,012	0,025
Variationskoeffizient VK:	12,41 %	3,1 %
Konfidenzintervall mit (1 - α) = 95 %:	0,87±0,09	(5,1±0,14)
Einheit:	$\mu\text{mol/mlxmin}$	x10 ⁻¹ mol/l

Serum:

	<u>v_{max}</u>	<u>k_i</u>
Mittelwert:	0,077	2,8x10 ⁻¹
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,010	0,32
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,0046	0,14
Varianz (s ²):	0,0001	0,1024
Variationskoeffizient VK:	12,98 %	11,43 %
Konfidenzintervall mit (1 - α) = 95 %:	0,077±0,009	(2,8±0,12)
Einheit:	$\mu\text{mol/mlxmin}$	x10 ⁻¹ mol/l

Nach dem t-Test für unabhängige Stichproben ergibt sich für die k_i - Überprüfung ein t von 14,5. Der Tabellenwert t₀ für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ und f = n₁ + n₂ - 2 = 8 Freiheitsgrade liegt bei 2,31. Da t größer als der Tabellenwert t₀ ist, wird die Nullhypothese H₀ mit der entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % verworfen.

Somit besteht ein signifikanter Unterschied der Inhibitorkonstante k_i von Angiotensin III im Seminalplasma und der k_i von Angiotensin III im Serum.

5.5.3.7. D-PHENYLALANYL-L-PHENYLALANYL-L-ARGININ CHLOROMETHYL-
KETON

Mit D-Phenylalanyl-L-Phenylalanyl-L-Arginin Chloromethylketon, einem starken Inhibitor für Kallikreine, wurde ein etwaiger inhibitorischer Einfluß auf die ACE-Aktivität überprüft.

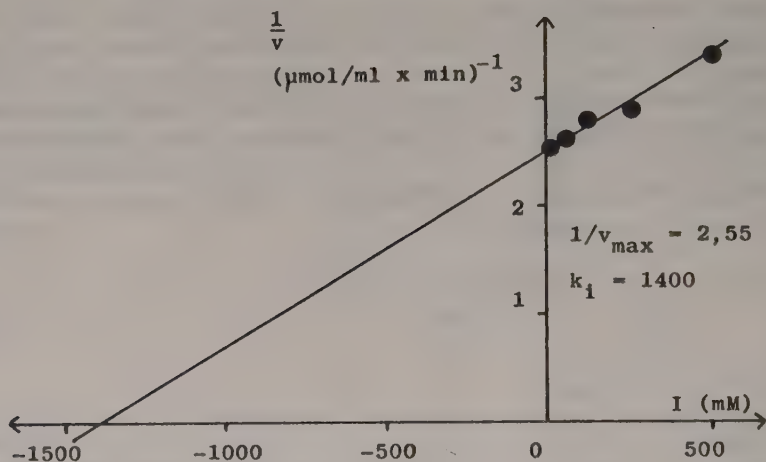
Die graphische Ermittlung aus dem Dixon-plot (Abb. 55) ergab für angereichertes ACE aus Seminalplasma und Serum folgende Werte:

$$\text{Seminalplasma: } v_{\max} = 0,392 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times \text{min} \\ k_i = 1,4 \text{ mol/l}$$

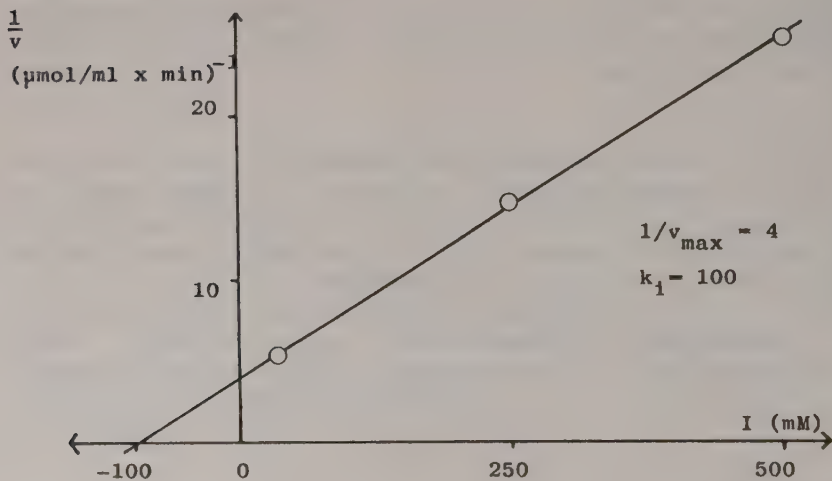
$$\text{Serum: } v_{\max} = 0,25 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times \text{min} \\ k_i = 1,0 \times 10^{-1} \text{ mol/l}$$

ABB. 55 : HEMMUNG DER ACE-AKTIVITÄT MIT D-PHE-ALA-L-PHE-ALA-L-ARG
CHLOROMETHYLKETON - DIXON-PLOT:

a: Seminalplasma



b: Serum



Statistische Analyse:

Seminalplasma:

	<u>v_{max}</u>	<u>k_i</u>
Mittelwert:	0,392	1,4
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,012	0,158
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,0052	0,071
Varianz (s ²):	0,00014	0,025
Variationskoeffizient VK:	3,06 %	11,29 %
Konfidenzintervall mit $(1 - \alpha) = 95 \%$:	0,392 $\pm$ 0,011	1,4 $\pm$ 0,14
Einheit:	$\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$	mol/l

Serum:

	<u>v_{max}</u>	<u>k_i</u>
Mittelwert:	0,25	1,0 $\times 10^{-1}$
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,082	0,158
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,037	0,071
Varianz (s ²):	0,0067	0,025
Variationskoeffizient VK:	32,8 %	15,8 %
Konfidenzintervall mit $(1 - \alpha) = 95 \%$:	0,25 $\pm$ 0,07	(1,0 $\pm$ 0,14)
Einheit:	$\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$	$\times 10^{-1} \text{ mol/l}$

Nach dem t-Test für unabhängige Stichproben ergibt sich für die k_i - Überprüfung ein t von 12,8. Der Tabellenwert t_0 für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ und $f = n_1 + n_2 - 2 = 8$ Freiheitsgrade liegt bei 2,31. Da t größer als der Tabellenwert t_0 ist, wird die Nullhypothese H_0 mit der entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % verworfen.

Somit besteht ein signifikanter Unterschied der Inhibitorkonstante k_i von D-Phe-Ala-L-Phe-Ala-L-Arg Chloromethyl-Keton im Seminalplasma und der k_i im Serum.

5.5.3.8. BRADYKININ POTENTIATOR B

Der Einfluß dieses Peptids, das die Aktivität von Bradykinin erhöht, auf die ACE-Aktivität wurde untersucht.

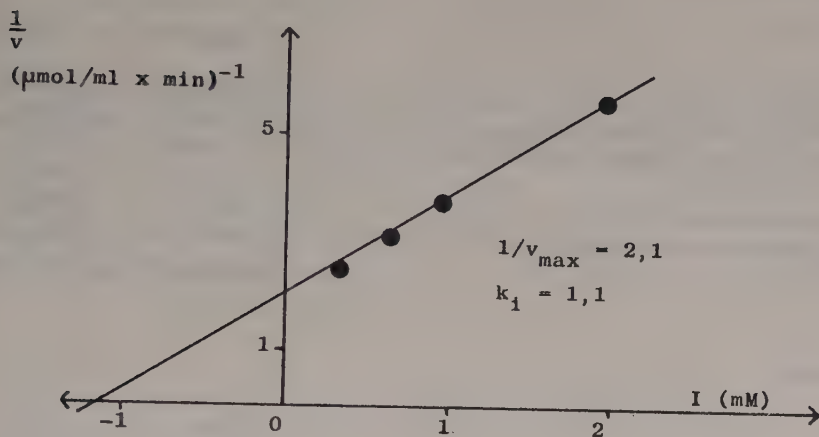
Die graphische Ermittlung aus dem Dixon-plot (Abb. 56) ergab für angereichertes ACE aus Seminalplasma und Serum folgende Werte:

Seminalplasma: $v_{\max} = 0,476 \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$
 $k_i = 1,1 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$

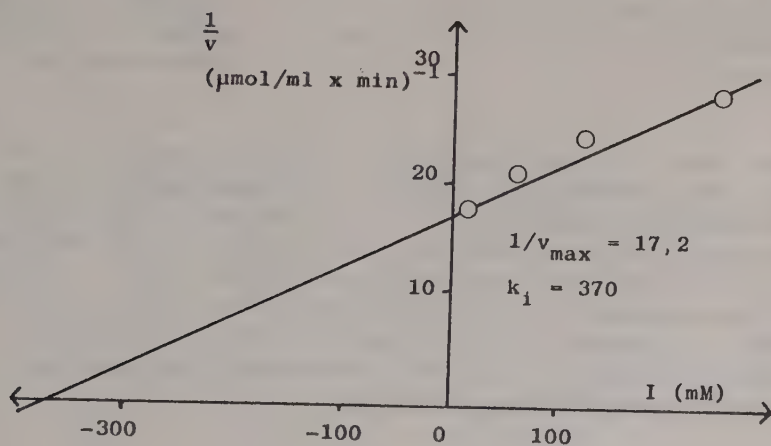
Serum: $v_{\max} = 0,058 \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$
 $k_i = 3,7 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$

ABB. 56: HEMMUNG DER ACE-AKTIVITÄT MIT BRADYKININ POTENTIATOR B
DIXON-PLOT:

a: Seminalplasma



b: Serum



Statistische Analyse:

Seminalplasma:

	<u>v_{max}</u>	<u>k₁</u>
Mittelwert:	0,476	$1,1 \times 10^{-3}$
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,0102	0,158
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,0046	0,071
Varianz (s ²):	0,00010	0,025
Variationskoeffizient VK:	2,14 %	14,36 %
Konfidenzintervall mit $(1 - \alpha) = 95 \%$:	$0,476 \pm 0,009$	$(1,1 \pm 0,14)$
Einheit:	$\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$	$\times 10^{-3} \text{ mol/l}$

Serum:

	<u>v_{max}</u>	<u>k₁</u>
Mittelwert:	0,058	$3,7 \times 10^{-4}$
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,012	0,32
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,0052	0,14
Varianz (s ²):	0,00014	0,1024
Variationskoeffizient VK:	20,69 %	8,65 %
Konfidenzintervall mit $(1 - \alpha) = 95 \%$:	$0,058 \pm 0,011$	$(3,7 \pm 0,28)$
Einheit:	$\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$	$\times 10^{-4} \text{ mol/l}$

Nach dem t-Test für unabhängige Stichproben ergibt sich für die k_1 - Überprüfung ein t von 4,62. Der Tabellenwert t_0 für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ und $f = n_1 + n_2 - 2 = 8$ Freiheitsgrade liegt bei 2,31. Da t größer als der Tabellenwert t_0 ist, wird die Nullhypothese H_0 mit der entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % verworfen.

Somit besteht ein signifikanter Unterschied der Inhibitorkonstante k_1 von Bradykinin Potentiator B im Seminalplasma und der k_1 im Serum.

5.5.3.9. BRADYKININ POTENTIATOR C

Mit diesem Peptid wurde ebenfalls der inhibitorische Einfluß auf die ACE-Aktivität untersucht.

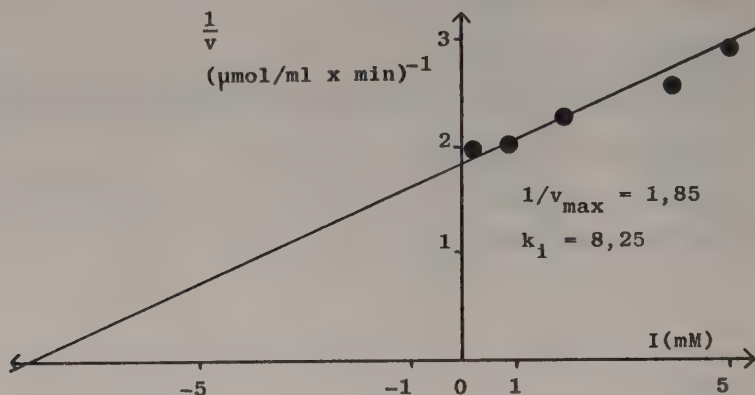
Die graphische Ermittlung aus dem Dixon-plot (Abb. 57) ergab für angereichertes ACE aus Seminalplasma und Serum folgende Werte:

Seminalplasma: $v_{\max} = 0,54 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$
 $k_i = 8,25 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$

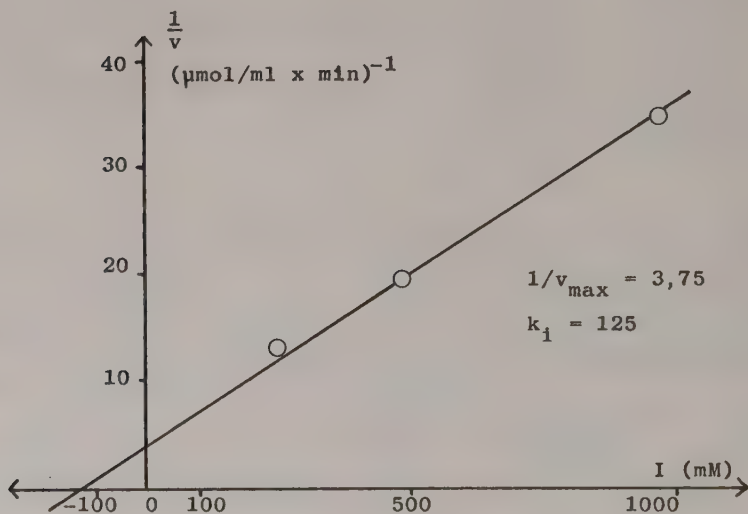
Serum: $v_{\max} = 0,266 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$
 $k_i = 1,25 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$

ABB. 57: HEMMUNG DER ACE-AKTIVITÄT MIT BRADYKININ POTENTIATOR C
DIXON-PLOT:

a: Seminalplasma



b: Serum



Statistische Analyse:

Seminalplasma:

	<u>v_{max}</u>	<u>k₁</u>
Mittelwert:	0,54	8,25x10 ⁻³
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,102	0,091
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,046	0,041
Varianz (s ²):	0,010	0,0083
Variationskoeffizient VK:	18,89 %	1,1 %
Konfidenzintervall mit (1 - α) = 95 %:	0,54±0,09	(8,25±0,08)
Einheit:	$\mu\text{mol/mlxmin}$	x10 ⁻³ mol/l

Serum:

	<u>v_{max}</u>	<u>k₁</u>
Mittelwert:	0,266	1,25x10 ⁻⁴
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,010	0,082
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,0046	0,037
Varianz (s ²):	0,0001	0,0067
Variationskoeffizient VK:	3,76 %	6,56 %
Konfidenzintervall mit (1 - α) = 95 %:	0,266±0,009	(1,25±0,07)
Einheit:	$\mu\text{mol/mlxmin}$	x10 ⁻⁴ mol/l

Nach dem t-Test für unabhängige Stichproben ergibt sich für die k₁ - Überprüfung ein t von 14,9. Der Tabellenwert t₀ für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ und f = n₁ + n₂ - 2 = 8 Freiheitsgrade liegt bei 2,31. Da t größer als der Tabellenwert t₀ ist, wird die Nullhypothese H₀ mit der entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % verworfen.

Somit besteht ein signifikanter Unterschied der Inhibitorkonstante k₁ von Bradykinin Potentiator C im Seminalplasma und der k₁ im Serum.

5.5.3.10. METHIONIN-ENKEPHALIN

Ein etwaiger inhibitorischer Einfluß von Methionin-Enkephalin auf die ACE-Aktivität wurde untersucht.

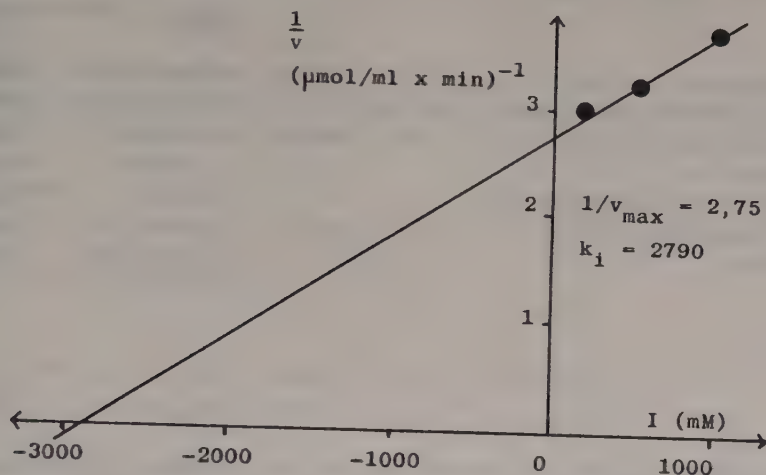
Die graphische Ermittlung aus dem Dixon-plot (Abb. 58) ergab für angereichertes ACE aus Seminalplasma und Serum folgende Werte:

Seminalplasma: $v_{\max} = 0,363 \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$
 $k_i = 2,79 \text{ mol/l}$

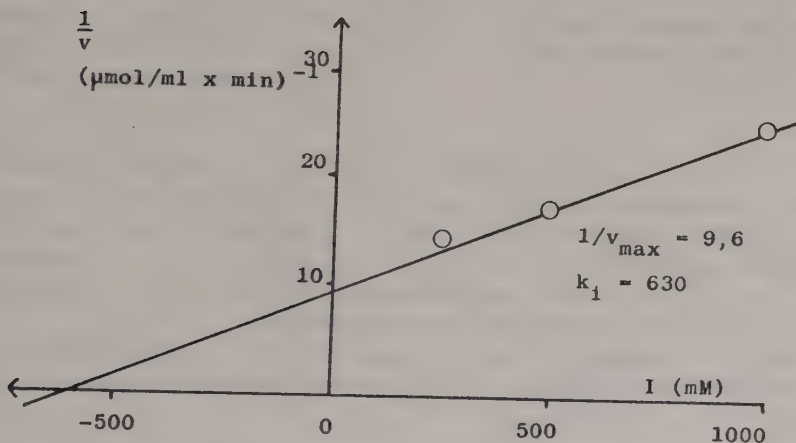
Serum: $v_{\max} = 0,104 \mu\text{mol/ml} \times \text{min}$
 $k_i = 6,3 \times 10^{-1} \text{ mol/l}$

ABB. 58: HEMMUNG DER ACE-AKTIVITÄT MIT METHIONIN-ENKEPHALIN
DIXON-PLOT:

a: Seminalplasma



b: Serum



Statistische Analyse:

Seminalplasma:

	<u>v_{max}</u>	<u>k_i</u>
Mittelwert:	0,363	2,79
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,011	0,058
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,0048	0,026
Varianz (s ²):	0,00012	0,0034
Variationskoeffizient VK:	3,03 %	2,08 %
Konfidenzintervall mit (1 - α) = 95 %:	0,363 $\pm$ 0,01	2,79 $\pm$ 0,05
Einheit:	$\mu\text{mol/ml}\times\text{min}$	mol/l

Serum:

	<u>v_{max}</u>	<u>k_i</u>
Mittelwert:	0,104	6,3 $\times 10^{-1}$
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,010	0,158
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,0046	0,071
Varianz (s ²):	0,0001	0,025
Variationskoeffizient VK:	9,62 %	2,51 %
Konfidenzintervall mit (1 - α) = 95 %:	0,104 $\pm$ 0,009	(6,3 $\pm$ 0,14)
Einheit:	$\mu\text{mol/ml}\times\text{min}$	$\times 10^{-1} \text{ mol/l}$

Nach dem t-Test für unabhängige Stichproben ergibt sich für die k_i - Überprüfung ein t von 28. Der Tabellenwert t₀ für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ und f = n₁ + n₂ - 2 = 8 Freiheitsgrade liegt bei 2,31. Da t größer als der Tabellenwert t₀ ist, wird die Nullhypothese H₀ mit der entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % verworfen.

Somit besteht ein signifikanter Unterschied der Inhibitorkonstante k_i von Methionin-Enkephalin im Seminalplasma und der k_i im Serum.

5.5.3.11. BESTATIN

Mit Bestatin als Inhibitor wurde ein etwaiger Einfluß auf die ACE-Aktivität untersucht.

Sowohl Seminalplasma-ACE als auch Serum-ACE werden von Bestatin nicht gehemmt. Sogar bei einer Konzentration von 1 mol/l konnte keine Hemmung erzielt werden.

5.5.3.12. NEUROTENSIN

Ein etwaiger inhibitorischer Einfluß von Neurotensin auf die ACE-Aktivität wurde untersucht.

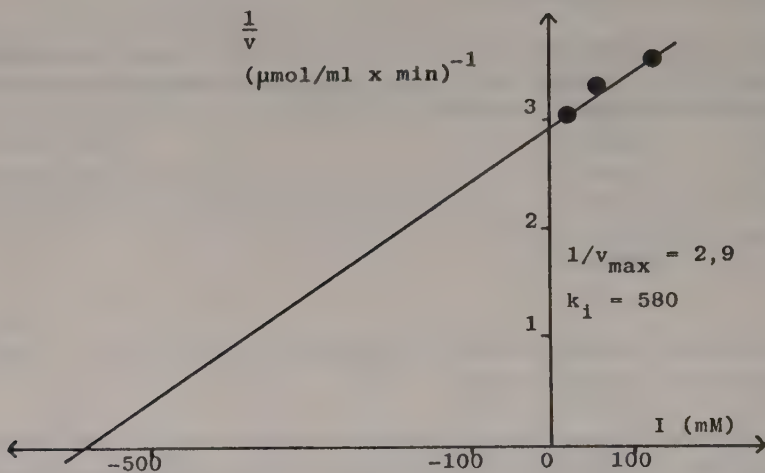
Die graphische Ermittlung aus dem Dixon-plot (Abb. 59) ergab für angereichertes ACE aus Seminalplasma und Serum folgende Werte:

$$\begin{aligned}\text{Seminalplasma: } v_{\max} &= 0,345 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times \text{min} \\ k_i &= 5,8 \times 10^{-1} \text{ mol/l}\end{aligned}$$

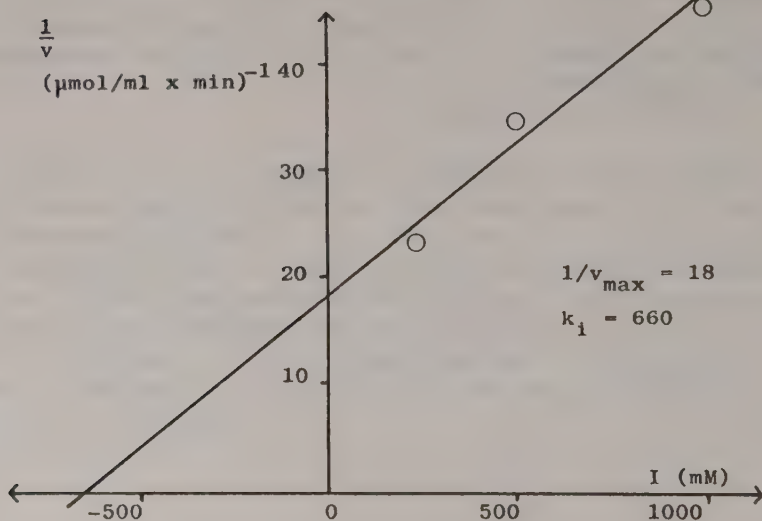
$$\begin{aligned}\text{Serum: } v_{\max} &= 0,055 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times \text{min} \\ k_i &= 6,6 \times 10^{-1} \text{ mol/l}\end{aligned}$$

ABB. 59 : HEMMUNG DER ACE-AKTIVITÄT MIT NEUROTENSIN
DIXON-PLOT:

a: Seminalplasma



b: Serum



Statistische Analyse:

Seminalplasma:

	<u>v_{max}</u>	<u>k_i</u>
Mittelwert:	0,345	5,8x10 ⁻¹
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,016	0,32
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,0071	0,14
Varianz (s ²):	0,00026	0,1024
Variationskoeffizient VK:	4,64 %	5,52 %
Konfidenzintervall mit (1 - α) = 95 %:	0,345 $\pm$ 0,014	(5,8 $\pm$ 0,28)
Einheit:	$\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$	x10 ⁻¹ mol/l

Serum:

	<u>v_{max}</u>	<u>k_i</u>
Mittelwert:	0,055	6,6x10 ⁻¹
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,0091	0,158
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,0040	0,071
Varianz (s ²):	0,00008	0,025
Variationskoeffizient VK:	16,55 %	2,39 %
Konfidenzintervall mit (1 - α) = 95 %:	0,055 $\pm$ 0,008	(6,6 $\pm$ 0,13)
Einheit:	$\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$	x10 ⁻¹ mol/l

Nach dem t-Test für unabhängige Stichproben ergibt sich für die k_i - Überprüfung ein t von 5,06. Der Tabellenwert t₀ für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ und f = n₁ + n₂ - 2 = 8 Freiheitsgrade liegt bei 2,31. Da t größer als der Tabellenwert t₀ ist, wird die Nullhypothese H₀ mit der entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % verworfen.

Somit besteht ein signifikanter Unterschied der Inhibitorkonstante k_i von Neurotensin im Seminalplasma und der k_i im Serum.

5.5.3.13. ZINCOV^R

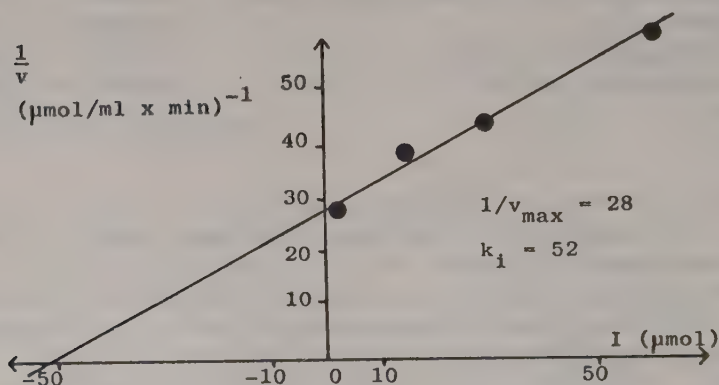
Mit dem Hydroxamidosäure-Derivat des Alanyl-glycin-amids als Inhibitor wurde die Hemmung der ACE-Aktivität untersucht.

Im Seminalplasma hemmt Zincov^R sogar in einer Konzentration von 10 mol/l die ACE-Aktivität nicht. Die ACE-Aktivität im Serum wird jedoch stark gehemmt.

Die graphische Bestimmung aus dem Dixon-plot (Abb. 60) ergab für die ACE-Aktivität in Serum folgende Werte:

$$\begin{aligned} \text{Serum: } v_{\max} &= 0,0357 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times \text{min} \\ k_i &= 5,2 \times 10^{-5} \text{ mol/l} \end{aligned}$$

ABB. 60: HEMMUNG DER ACE-AKTIVITÄT MIT ZINCOV^R IN SERUM
(DIXON-PLOT):



Statistische Analyse (Serum):

	<u>v_{max}</u>	<u>k_i</u>
Mittelwert:	0,0357	5,2×10 ⁻⁵
Standardabweichung (s) σ_{n-1} :	0,0011	0,32
Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) σ :	0,00048	0,14
Varianz (s ²):	0,0000012	0,1024
Variationskoeffizient VK:	3,08 %	6,15 %
Konfidenzintervall mit (1 - α) = 95 %:	0,0357±0,001	(5,2±0,28)
Einheit:	μmol/ml×min	×10 ⁻⁵ mol/l

6. DISKUSSION

Der Einfluß von Seminalplasma-Komponenten auf physiologische Funktionen der Spermatozoen wurde in der Vergangenheit schon oft untersucht. Trotz einer Vielzahl entsprechender Daten in der Literatur sind jedoch noch viele Fragen vor allem zur pathophysiologischen Bedeutung von Seminalplasma Komponenten offen geblieben. Es ist vielfach bei Fertilitätsstörungen auch heute noch nicht möglich deren pathophysiologische Ursache zu erkennen und dann davon ausgehend eine zweckmäßige Therapie einzuleiten.

Ausgehend von dieser Erkenntnis läßt sich die Folgerung ableiten, daß Verbesserungen der therapeutischen und diagnostischen Möglichkeiten in der Andrologie nur durch eine Intensivierung der Grundlagenforschung erreicht werden können.

Zu den Komponenten des Seminalplasma, deren funktionelle Bedeutung noch wenig erforscht wurde, gehört auch das Angiotensin-converting-enzyme (ACE). Andererseits stand in der Kininforschung schon lange fest, daß die "Kinine" genannten vasoaktiven Peptide in vivo sehr rasch abgebaut werden, wobei dieser Abbau durch ACE, ein Kininase II genanntes Enzym und durch unspezifische Kininasen erfolgen sollte. Lange hielt sich in dem Zusammenhang auch die Ansicht, daß es sich bei Kininase II und dem ACE um zwei unterschiedliche Enzyme handelt. Inzwischen wurde jedoch die Identität von Kininase II und ACE bewiesen (114).

ACE ist in der Lage sowohl Kinine als auch das Dekapeptid Angiotensin I und wahrscheinlich noch eine ganze Reihe anderer biologisch aktiver Peptide als Substrate zu verwenden. Davon kann auf eine regulatorische Bedeutung des ACE als Bindeglied zwischen dem Renin Angiotensin-System und dem Kallikrein-Kinin-System geschlossen werden.

Obwohl eine reproduktionsphysiologische Bedeutung von Kallikrein schon lange bekannt ist und auch therapeutisch verwertet wird, ist eine entsprechende Funktion von ACE unbekannt. Dabei werden im Seminalplasma des Menschen ACE-Aktivitäten gefunden, welche

die aller anderen Gewebe und Körperflüssigkeiten weit übersteigen. Analoge Ergebnisse, zwar nicht beim Menschen sondern bei der Ratte, wurden erstmals von Hohlbrugger et al. (37) beschrieben. Die Autoren fanden, daß bei der Ratte die höchsten ACE-Aktivitäten in Hoden und Nebenhoden vorhanden waren und nicht etwa in Geweben, die an der Regulation des Blutdrucks beteiligt sind.

Unsere Untersuchungen hatten das Ziel durch eine möglichst umfassende Charakterisierung des ACE seine funktionelle Bedeutung für die männliche Fertilität besser zu verstehen.

Unseren Untersuchungen lagen zwei Zielsetzungen zugrunde:

1. Die Charakterisierung des ACE im Seminalplasma:

Dazu gehörte auch die Bestimmung der ACE-Aktivität in den verschiedenen Sekreten des männlichen Genitaltraktes und als Vergleich die Charakterisierung der ACE-Aktivitäten in Blutserum.

2. Die Bedeutung der Assoziation der ACE-Aktivität im Seminalplasma an vesikuläre Strukturen. Außerdem stellten wir Überlegungen über den funktionellen Stellenwert dieser Bindung an makromolekulare Strukturen an, zumal es experimentelle Hinweise gibt, wonach diese Vesikel eine Funktion bei der Motilität der Spermatozoen haben könnten. Andererseits wurde in unserem Labor der Nachweis erbracht, daß ACE an der Regulation der Motilität nicht direkt beteiligt ist.

3. Bei der vergleichenden Charakterisierung der katalytischen Eigenschaften des ACE in Seminalplasma und Serum wurde der bedeutsame Befund erhoben, daß sich die katalytischen Eigenschaften von ACE aus Seminalplasma und Serum voneinander statistisch signifikant unterscheiden.

6.1. VORVERSUCHE

In Vorversuchen wurde die ACE-Bestimmungsmethode standardisiert. Dabei wurde in unserem Labor eine Möglichkeit gefunden störende und die Zuverlässigkeit der Bestimmung beeinträchtigende proteolytische Aktivitäten, die vor allem im Blutserum vorhanden waren, durch Lösungsmittelzugabe zu unterdrücken. Erst damit war die Basis für die Vergleichbarkeit der ACE-Aktivitäten in Seminalplasma und in Serum geschaffen.

6.2. BESTIMMUNG DER ACE-AKTIVITÄT IN VERSCHIEDENEN KÖRPERFLÜSSIGKEITEN

Die ACE Aktivität wurde auch in den Sekreten der verschiedenen akzessorischen Geschlechtsdrüsen des männlichen Genitaltrakts, soweit sie gewonnen werden konnten, bestimmt und mit der ACE-Aktivität im Blutserum männlicher und weiblicher Patienten verglichen. Dabei wurde eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen in unserem Labor und mit den Angaben in der Literatur gefunden (18, 39, 82, 115).

Im Seminalplasma von Patienten mit Normozoospermie wurden signifikant höhere ACE-Aktivitäten als in Seren männlicher und weiblicher Patienten gefunden (Abb. 22, 23, 32, 33, 34, 35). Die gemessene ACE-Aktivität in Seminalplasma betrug im Mittel das 68-fache der ACE-Aktivität von Seren männlicher Patienten bzw. das 147-fache der ACE-Aktivität von Seren weiblicher Patienten.

69,19 $\pm$ 0,92 % (Abb. 26) der Volumenaktivität von ACE, die im Mittel in Seminalplasma von Patienten mit Normozoospermie gefunden wurde, war auch in Prostata-Exprimat nachweisbar. Dies führt zu dem Schluß, daß mehr als die Hälfte der ACE-Aktivität in Seminalplasma aus der Prostata stammen muß, wenn der Anteil des Prostatasekrets am gesamten Ejakulatvolumen mit 30 % angenommen wird. Die Beteiligung von Hoden- und Nebenhodengewebe an der Sekretion des ACE im männlichen Genitaltrakt wurde durch die Messung der ACE-Aktivitäten in Seminalplasma deutlich, das von

Patienten vor und nach Vasektomie erhalten wurde. Denn in Seminalplasma wurden nach Vasektomie Aktivitätsabnahmen von $41,38 \pm 10,21$ % festgestellt (Abb. 24). Dieses Resultat wird durch die Ergebnisse der ACE-Aktivitätsbestimmungen in Extrakten von Hoden- und Nebenhodengewebe bestätigt.

Das Vorhandensein einer zwar geringen, jedoch immer nachweisbaren ACE-Aktivität in gewaschenen, d.h. weitgehend von Seminalplasma befreiten Spermatozoen, könnte für die Aufklärung der Funktion des ACE bei der Reproduktion von Bedeutung sein.

Untersuchungen von Placzek et al. (70) zeigten, daß hohe Konzentrationen von Captopril, einem spezifischen Inhibitor von ACE ($k_1 = 5,0 \times 10^{-9}$ mol/l), eine Stimulierung der Spermatozoen-Motilität in vitro bewirken. Placzek et al. konnten jedoch auch zeigen, daß ACE nicht direkt an der Regulation der Spermatozoen-Motilität beteiligt ist.

6.3. BEDEUTUNG DER MEMBRANVESIKEL FÜR DIE ACE AKTIVITÄT IM SEMINALPLASMA

Von Stegmayr et al. (97) wurde gefunden, daß nach hochtouriger Zentrifugation von Seminalplasma makromolekulare Strukturen sedimentieren, die im Elektronenmikroskop als Membranvesikel identifiziert wurden (Abb. 15). Von Stegmayr et al. wurden diese Membranvesikel als Prostatasomen bezeichnet, in der Annahme, daß sie ausschließlich aus der Prostata stammen. Wir hingegen sind aufgrund unserer experimentellen Befunde der Ansicht, daß dies nicht zutrifft. Denn in menschlichem Seminalplasma ist nach Vasektomie die ACE-Aktivität signifikant erniedrigt, d.h. ein wesentlicher Teil des Enzyms muß aus Hoden und Nebenhodengewebe stammen.

Da von uns außerdem gezeigt wurde, daß der überwiegende Teil der ACE-Aktivität, vor allem in nativem Seminalplasma, an diese Membranvesikel assoziiert ist, liegt der zwingende Schluß nahe, daß auch ein Teil dieser Membranvesikel aus Hoden- und Nebenhodengewebe stammen muß. Damit ist ihre Bezeichnung als

"Prostasomen" unrichtig.

Die Prostata ist allerdings ein für die Fertilität des Mannes außerordentlich wichtiges tubuloalveoläres Organ mit exokriner Funktion. Von histologischen Studien ist bekannt, daß die azinären epithelialen Zellen für die sekretorische Aktivität und damit auch für die Sekretion der Membranvesikel verantwortlich sind. Die Vesikel sind meist von einer trilaminaren Membranstruktur umgeben (76) und reichern sich bei der Dichtegradienten-Zentrifugation bei einer Dichte von $1,03 \text{ g/cm}^3$ an (75).

Der Gehalt der Membranvesikel an Calcium, Magnesium und Zink übertrifft den vom Seminalplasma um ein Mehrfaches (98). Außerdem enthalten die Membranvesikel den Großteil der ATPase-Aktivität, einen Teil der Aktivität der sauren Phosphatase, den überwiegenden Teil der L-Leucinaminopeptidase-Aktivität, sowie auch das im Seminalplasma nachweisbare calciumbindende Protein Calmodulin. Nach Ergebnissen in unserem Labor haben sie auch, wie schon erwähnt wurde, einen stimulierenden Einfluß auf die Spermatozoen-Motilität in vitro (63).

Bemerkenswert ist auch das gemeinsame Vorkommen von ACE und calciumbindenden Proteinen in makromolekularen Strukturen, denn dies läßt die Annahme zu, daß ACE auch bei Calciumtransportprozessen beteiligt sein könnte, oder, daß bei Regulationsmechanismen von biologischen Systemen an denen ACE beteiligt ist, auch Calciumtransportprozesse eine Rolle spielen. Vielleicht hat ACE bei allen Calciumtransportprozessen eine regulatorische Funktion. Solche Regulationsmechanismen erfordern in biologischen Systemen eine Kompartimentierung und spezialisierte Strukturen, die in der Lage sind Calciumionen hin zu bestimmten Domänen zu transportieren und zu inaktivieren, um sie dann bei Bedarf wieder abzurufen. Solche Funktionen sind, nach allem was man weiß, in biologischen Membranen angesiedelt, d.h. direkt am Ort von energieabhängigen Calciumtransport-Systemen, wie sie auch in den aus Seminalplasma isolierbaren Membranvesikeln wahrscheinlich vorhanden sind.

Wir können durch unsere Experimente belegen, daß ein großer Teil der ACE-Aktivität des Seminalplasma an diese Vesikel assoziiert ist. Es ist sogar wahrscheinlich, daß das Ausmaß der Assoziation der ACE-Aktivität an die Membranvesikel ein brauchbares Kriterium zur Beurteilung der Nativität von Seminalplasma, oder auch des Gesamt-Ejakulates darstellt. Dies ist außerdem für die Reindarstellung des ACE aus Seminalplasma von Bedeutung, da durch einen einzigen Zentrifugationsschritt ein Großteil der vorhandenen Aktivität vom größten Teil der Begleitproteine leicht abgetrennt werden kann und dadurch die Anreicherung der Enzymaktivität wesentlich vereinfacht wird.

Die Assoziation der ACE-Aktivität an makromolekulare Strukturen konnte auch durch gelchromatographische Experimente demonstriert werden (Abb. 44, 45). Das Elutionsverhalten isolierter Vesikel war völlig identisch (Abb. 39, 40) mit ihrem Elutionsverhalten in nativem Seminalplasma. Durch entsprechende gelchromatographische Auftrennungen von Prostata-Exprimaten wurden analoge Ergebnisse erzielt (Abb. 46, 47). Die von Stegmayr vertretene Hypothese, wonach die Membranvesikel ausschließlich aus der Prostata stammen, ließ sich somit auch gelchromatographisch nicht bestätigen.

Nicht in Widerspruch dazu stehen auch die Ergebnisse der ACE-Bestimmung in Seminalplasma von Vasektomie-Patienten. Denn aus der Verteilung der ACE-Aktivität bei Annahme einer gleichmäßigen Vesikel-Assoziation kann gefolgert werden, daß ein Teil der Vesikel aus dem Hoden und Nebenhoden stammen muß.

Durch Solubilisierungsexperimente wurde ein völlig anderes Elutionsverhalten der ACE-Aktivität bei gelchromatographischer Auftrennung erreicht. Denn die ACE-Aktivität wurde in einem Bereich eluiert, der größenordnungsmäßig einem Molekulargewicht von 100000 - 150000 Dalton entspricht (Abb. 43).

Hinsichtlich der Stabilität der Membranvesikel könnte gezeigt werden, daß mehrmaliges Schockgefrieren bei -20°C keine signifikanten Unterschiede in den Eigenschaften unbehandelter und gefrierschockbehandelter Vesikel bewirkte. Dies spricht für eine

hervorragende Stabilität der Vesikel in Bezug auf ihre thermische Belastbarkeit. Temperaturunterschiede von 57°C (-20°C bis $+37^{\circ}\text{C}$) konnten die makromolekulare Struktur der Vesikel offensichtlich nicht beeinflussen. Dieses Ergebnis ist auch deshalb sehr bedeutsam, weil dadurch alle Experimente mit isolierten Vesikeln an Wert gewinnen. Man ist bei entsprechenden Untersuchungen nicht unbedingt auf frisches Material, d.h. auf frische Ejakulate angewiesen. Bei tiefen Temperaturen sind die Vesikel sehr lange haltbar. Wir haben bei allen unseren Untersuchungen keine ins Auge springenden Veränderungen der strukturellen Eigenschaften der Vesikel feststellen können.

6.4. EIGENSCHAFTEN VON ANGIOTENSIN CONVERTING-ENZYME IM SEMINALPLASMA UND SERUM

6.4.1. EINFLUSS DER TEMPERATUR UND SUBSTRATKONZENTRATION

Zu den ersten von uns durchgeführten vergleichenden Untersuchungen der kinetischen Eigenschaften des ACE in Seminalplasma und in Serum gehörte die Überprüfung der Temperaturabhängigkeit der Enzym-Aktivität in Seminalplasma und Serum. Dabei wurden auffallende Unterschiede festgestellt (Abb. 48). Denn die maximale Aktivität des Seminalplasma-ACE ist im Gegensatz zur maximalen ACE-Aktivität in Serum auch bei niedrigeren Temperaturen (32°C) noch vorhanden. Somit kann das ACE des Seminalplasma nicht nur innerhalb des Körpers, d.h. bei normaler Körpertemperatur (37°C), sondern nach dem Descensus testis auch bei tieferen Temperaturen im Skrotum seine volle Aktivität entfalten. Dieses breite Temperaturoptimum der ACE-Aktivität in Seminalplasma ist möglicherweise auch dann von Bedeutung, wenn das Spermatozoon mit der weiblichen Eizelle fusioniert.

Durch die Verwendung unterschiedlicher Substratkonzentrationen bei der Messung der ACE-Aktivität konnte in Seminalplasma und in Serum eine parallele Abhängigkeit der ACE-Aktivität von der Substratkonzentration nachgewiesen werden (Abb. 49). Bei einer Substratkonzentration von 5 mmol/l wurden sowohl bei ACE aus Seminalplasma und aus Serum die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten erreicht. Somit konnten die in der Literatur (z.B. von Cushman et al.) angegebenen optimalen Substratkonzentrationen bestätigt werden (14).

Hinsichtlich der Ergebnisse zur Ermittlung der maximalen Umsatzgeschwindigkeiten v_{max} und Michaelis-Konstanten k_m des ACE in Seminalplasma und Serum ließen sich jedoch signifikante Unterschiede feststellen (Abb. 49). So ist für Serum-ACE eine höhere Substratkonzentration nötig, um eine Halbsättigung des Enzyms zu erreichen, als beim Seminalplasma-ACE, d.h. die Affinität des Substrates Hip-His Leu zum Serum ACE ist geringer als zum Seminalplasma ACE.

Diese unterschiedlichen Substrataffinitäten sind Hinweise für strukturelle Unterschiede in den katalytischen Zentren von Serum ACE und Seminalplasma-ACE.

6.4.2. EINFLUSS DES PH-WERTES

ACE erweist sich auch bei einem pH-Wert von 8,0 noch als voll aktiv. Dies bedeutet, daß das Enzym sowohl im Seminalplasma und auch im Cervix-Mucus voll aktiv sein kann, d.h. auch von der pH-Abhängigkeit der ACE Aktivität kann auf eine Funktion des Enzyms im weiblichen Genitaltrakt geschlossen werden.

6.4.3. EINFLUSS VERSCHIEDENER INHIBITOREN

Die Verwendung spezifischer und unspezifischer Inhibitoren hat für die Charakterisierung von Peptidasen und deshalb auch für die Aufklärung der Funktion von ACE eine große Bedeutung erlangt. Dies erbrachten schon frühere Untersuchungen in unserem Labor und wurde auch in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (7, 14, 40, 66). Es wurde deshalb auch in dieser Arbeit mit Hilfe solcher Inhibitoren das Seminalplasma-ACE und im Vergleich dazu das Serum ACE charakterisiert.

Wenn über die Funktionsweise von ACE-Inhibitoren Überlegungen angestellt werden, muß auch bedacht werden, daß bei der Interpretation entsprechender physiologischer Experimente auch das Salzzückhaltevermögen von Angiotensin II, dessen Bildung durch die Hemmung der ACE-Aktivität verhindert wird, in die Betrachtungen mit einbezogen werden muß. Außerdem wird die Wirkung von Angiotensin II auch noch durch Veränderungen des Calcium-Stoffwechsels der Zelle beeinflusst. Wahrscheinlich können auf diese Weise die oft beträchtlichen Nebenwirkungen der ersten therapeutisch genutzten ACE-Inhibitoren, wie z.B. Captopril^R, erklärt werden. Diese ersten Nebenwirkungen waren es auch welche die Synthese einer neuen Klasse von therapeutisch

verwendbaren ACE-Inhibitoren ohne Sulfhydrylgruppen notwendig machten. Möglicherweise liegen aber bei den in der Hochdrucktherapie eingesetzten ACE-Inhibitoren ganz andere molekulare Wirkungsmechanismen zugrunde. Denn das Herz ist, wie neueste Untersuchungen belegen, auch ein Organ das Hormone zu synthetisieren in der Lage ist. Ein solches Hormon mit dem Namen atriales natriuretisches Peptid (ANP) bewirkt im Tierexperiment eine starke Diurese und senkt den Blutdruck durch seine vasodilatatorische Wirkung, wobei der Angriffspunkt des Hormons wahrscheinlich an der glatten Muskulatur der Gefäße liegt. Es erscheint nun plausibel anzunehmen, daß in den Wirkungsmechanismus auch ACE involviert ist.

Für unsere Untersuchungen wurde die spezifische ACE-Aktivität aus Seminalplasma und aus Serum gelchromatographisch angereichert. In Vorversuchen wurde ermittelt, daß durch die Verwendung von teilweise gereinigtem ACE die gleichen Werte erhalten werden, wie bei Verwendung von nativem Seminalplasma oder Blutserum.

Insgesamt erbrachten die Experimente beachtliche Unterschiede bei den katalytischen Eigenschaften (Abb. 61).

So bewirkte Bradykinin, ein physiologisches Substrat, jeweils eine Hemmung des ACE in Seminalplasma und Serum, wobei für die ACE-Hemmung im Seminalplasma eine signifikant höhere Bradykinin-Konzentration erforderlich war als für die ACE-Hemmung in Serum. Die Hemmversuche mit den Kininen Kallidin und Methionylkallidin erbrachten keine signifikanten Unterschiede der Ergebnisse bei ACE aus Seminalplasma und Serum.

Mit dem physiologischen ACE-Substrat Angiotensin I konnte selbst bei unphysiologisch hohen Konzentrationen keine Hemmung der ACE Aktivität aus beiden Quellen erreicht werden.

Dagegen wurde mit Angiotensin II und Angiotensin III jeweils eine Hemmung erreicht, wobei sich Unterschiede zwischen der ACE-Hemmung im Seminalplasma und Serum nachweisen ließen.

ABB. 61 : HEMMSTOFFCHARAKTERISTIK DES ACE IM SEMINALPLASMA UND SERUM:

Inhibitor	Seminalplasma		Serum	
	$v_{\max}$ ($\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}}$)	k_i (mol)	$v_{\max}$ ($\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}}$)	k_i (mol)
Bradykinin	$0,513 \pm 0,017$	$(5,95 \pm 0,12) \times 10^{-1}$	$0,128 \pm 0,011$	$(2,25 \pm 0,07) \times 10^{-3}$
Kallidin	$0,8 \pm 0,14$	$(1,0 \pm 0,20) \times 10^{-1}$	$0,05 \pm 0,013$	$(1,15 \pm 0,14) \times 10^{-1}$
Methionylkallidin	$1,0 \pm 0,14$	$(5,0 \pm 1,17) \times 10^{-2}$	$0,077 \pm 0,009$	$(3,7 \pm 0,14) \times 10^{-2}$
Angiotensin I	keine Hemmung		keine Hemmung	
Angiotensin II	$0,55 \pm 0,07$	$1,05 \pm 0,06$	$0,166 \pm 0,009$	$(8,0 \pm 0,67) \times 10^{-2}$
Angiotensin III	$0,87 \pm 0,09$	$(5,1 \pm 0,14) \times 10^{-1}$	$0,077 \pm 0,009$	$(2,8 \pm 0,12) \times 10^{-1}$
D-Phe-Ala-L-Phe-Ala-L-Arg-				
Chloromethylketon	$0,392 \pm 0,011$	$1,4 \pm 0,14$	$0,25 \pm 0,07$	$(1,0 \pm 0,14) \times 10^{-1}$
Bradykinin Potentiator B	$0,476 \pm 0,009$	$(1,1 \pm 0,14) \times 10^{-3}$	$0,058 \pm 0,011$	$(3,7 \pm 0,28) \times 10^{-4}$
Bradykinin Potentiator C	$0,54 \pm 0,09$	$(8,25 \pm 0,08) \times 10^{-3}$	$0,266 \pm 0,009$	$(1,25 \pm 0,07) \times 10^{-4}$
Methionin-Enkephalin	$0,363 \pm 0,01$	$2,79 \pm 0,05$	$0,104 \pm 0,009$	$(6,3 \pm 0,14) \times 10^{-1}$
Bestatin	keine Hemmung		keine Hemmung	
Neurotensin	$0,345 \pm 0,014$	$(5,8 \pm 0,28) \times 10^{-1}$	$0,055 \pm 0,008$	$(6,6 \pm 0,13) \times 10^{-1}$
Zincov ^R	keine Hemmung		$0,036 \pm 0,001$	$(5,2 \pm 0,28) \times 10^{-5}$

Das synthetische Oligopeptid D-Phe-Ala-L-Phe-Ala-L-Arg Chloromethylketon, welches ein sehr starker Inhibitor für Kallikreine ist, erwies sich als sehr schwacher ACE-Inhibitor. Es ließ sich jedoch auch mit dieser Verbindung ein signifikanter Unterschied bei der Hemmung von ACE aus Seminalplasma und Serum nachweisen.

Untersuchungen mit Bradykinin Potentiator B und C zeigten eine mäßige bis starke Hemmwirkung auf das ACE in Seminalplasma und in Serum, wobei sich ebenfalls signifikante Unterschiede zeigten. Bestätigt werden konnte bei diesen Experimenten, daß Peptide mit COOH terminalen Pro-Pro - Enden eine Hemmung der ACE-Aktivität bewirken (19, 23, 68, 94).

Methionin-Enkephalin, welches nach Hudgin et al. (40) einen starken inhibitorischen Einfluß ($k_i = 10^{-6}$ mol/l) auf Enkephalinase ausübt, erwies sich als sehr schwacher Inhibitor der ACE-Aktivität.

Ebenso führte Neurotensin, ein weiterer Enkephalinase Inhibitor (40), nur in unphysiologisch hohen Konzentrationen zu einer schwachen Hemmung der ACE-Aktivität im Seminalplasma und im Serum.

Bestatin, ebenfalls ein Enkephalinase-Inhibitor, führte zu keiner Hemmung der ACE-Aktivität, weder im Seminalplasma noch im Serum.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Untersuchungen von Benuck und Marks (7), die bei der Ratte die Identität von ACE und einer membrangebundenen Enkephalinase postulierten. Sie bestätigen jedoch die Ergebnisse anderer Untersuchungen, welche die Verschiedenheit von ACE und Enkephalinase nachwiesen (4, 8, 32, 102, 103).

Zincov^R ist ein sehr potenter Inhibitor von Zink enthaltenden Metalloendoproteasen. Die Hemmung beruht auf einer Kreuzreaktion der aktiven Zentren mit einer funktionellen Gruppe des Inhibitors durch Koordination mit dem Zink-Atom. Zincov^R war nicht in der Lage ACE aus Seminalplasma zu hemmen. Dagegen erwies sich die Substanz als sehr potenter Inhibitor des ACE in Serum ($k_i = (5,2 \pm 0,28) \times 10^{-5}$ mol/l). Da das ACE aus Seminalplasma erst nach 40-facher Anreicherung verwendet wurde, können mögliche Störfaktoren, wie die Ergebnisse von Vorversuchen belegen,

weitgehend ausgeschlossen werden. Dies bedeutet, daß das ACE aus Seminalplasma aufgrund sterischer Gegebenheiten im Bindungszentrum offensichtlich nicht in der Lage ist, den Inhibitor in geeigneter Weise zu binden. Wahrscheinlich kommt auch die Koordination mit dem Zink Atom nicht zustande. Ein denkbarer, jedoch sehr unwahrscheinlicher, Grund dafür könnte auch sein, daß das ACE des Seminalplasma nicht Zink, sondern ein anderes Schwermetall enthält, mit dem unter den gegebenen experimentellen Bedingungen die Ausbildung einer Koordinations-Bindung nicht möglich ist. Dafür gibt es jedoch keinen Beleg. Prinzipiell ist es jedoch möglich Zink durch andere Schwermetalle wie Mangan, aber auch durch Calcium zu ersetzen.

Unsere Untersuchungen lieferten zum ersten Mal einen konkreten Hinweis, daß zwischen dem ACE des Seminalplasma und dem ACE des Serum Unterschiede in den katalytischen Eigenschaften bzw. im strukturellen Aufbau der aktiven Zentren bestehen. Bei den Untersuchungen wurde gefunden, daß die ACE Aktivität des Serums in vielen Fällen schon bei niedrigeren Hemmstoff-Konzentrationen gehemmt wurde, während bei der Hemmung der ACE-Aktivität im Seminalplasma hierfür höhere, z.T. sogar unphysiologisch hohe Hemmstoff-Konzentrationen nötig waren.

Außerdem läßt die äußerst schwache Hemmung der ACE-Aktivität mit biologisch aktiven Peptiden, die dabei in unphysiologisch hohen Konzentrationen eingesetzt werden mußten, den Schluß zu, daß diese Peptide weder im Seminalplasma noch im Serum einen regulatorischen Einfluß auf die ACE-Aktivität haben.

Die Bedeutung der oben erwähnten Unterschiede der katalytischen Eigenschaften von ACE aus Seminalplasma und aus Serum sowie ein daraus sich ergebender therapeutischer Nutzen sind jedoch heute noch nicht abzuschätzen.

7. S C H L U S S F O L G E R U N G E N

Es war das Ziel der Arbeit die funktionelle Bedeutung des ACE im Seminalplasma einer Klärung näher zu bringen. Außerdem wurden die katalytischen Eigenschaften des ACE in Seminalplasma mit denen des ACE in Serum verglichen.

Die Resultate bestätigten einerseits die bisher in der Literatur beschriebenen Ergebnisse, andererseits brachten sie neue Erkenntnisse hinsichtlich der Eigenschaften der verschiedenen sekretorischen Drüsen des männlichen Genitaltrakts und ihre Bedeutung für die ACE-Aktivität im Seminalplasma. Auch wurde das Vorkommen von ACE in Spermatozoen gezeigt.

Eine Vielzahl von Experimenten wird in Zukunft noch erforderlich sein, um die funktionelle Bedeutung des ACE im Seminalplasma einer Klärung näher zu bringen. Insbesondere muß die physiologische und pathophysiologische Bedeutung der ACE-Aktivität der Spermatozoen vor allem hinsichtlich der Bedeutung für die Motilität noch untersucht werden.

Mit Hilfe einer Reihe spezifischer und unspezifischer Peptidase-Inhibitoren gelang es zum ersten Mal Hinweise für Unterschiede in den katalytischen Eigenschaften von ACE, das von unterschiedlichen Geweben stammt, zu liefern. Möglicherweise sind diese unterschiedlichen katalytischen Eigenschaften durch strukturelle Unterschiede in den katalytischen Zentren bedingt.

Diese Hypothese muß durch weitere Untersuchungen erhartet werden. Sollte es sich bewahrheiten, daß es im menschlichen Körper mehr als e i n ACE gibt, so müßte als nächstes die physiologische Bedeutung dieses Phänomens einer Klärung näher gebracht werden.

Von Bedeutung wären auch die therapeutischen Konsequenzen, die sich aus dem Vorhandensein verschiedener ACE's mit unterschiedlichen katalytischen Eigenschaften, die vielleicht streng gewebsspezifisch sind, ergäben.

Es ist zu hoffen, daß durch eine Intensivierung der Grundlagenforschung in Zukunft noch weitere funktionelle Zusammenhänge hinsichtlich der Bedeutung des ACE aufgeklärt werden können, vor allem, daß mehr diagnostische und therapeutische Verfahren zur Verfügung stehen, um eine bessere Selektion des Patientengutes vornehmen zu können und um wirksamere Konzepte für die Therapie der männlichen Infertilität zu entwickeln.

8. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Eigenschaften von Angiotensin-converting-enzyme aus menschlichem Seminalplasma untersucht. Im Vergleich dazu wurden auch die Eigenschaften von ACE aus menschlichem Blutserum charakterisiert.

Die Enzymaktivitäten wurden mit der von CUSHMAN und CHEUNG angegebenen spektralphotometrischen Methode nach den in der klinischen Chemie üblichen Regeln bestimmt.

Der Vergleich der ACE-Aktivitäten der unterschiedlichen sekretorischen Anteile des Ejakulates mit der Aktivität des Enzyms in Blutserum ergab, daß die ACE-Aktivität in Seminalplasma das 68-fache der ACE Aktivität in Seren männlicher Patienten bzw. das 147-fache der ACE-Aktivität in Seren weiblicher Patienten beträgt. Prostata-Extrakte von Patienten mit Normozoospermie enthalten $69,19 \pm 0,92$ % der ACE-Aktivität von Seminalplasma, d.h. der größere Teil der nachweisbaren ACE Aktivität stammt aus der Prostata, wenn in Rechnung gestellt wird, daß der Anteil des Prostata-Sekrets am gesamten Ejakulatvolumen nur maximal 30 % beträgt.

ACE-Aktivität konnte auch in gewaschenen, d.h. weitgehend von Seminalplasma befreiten Spermatozoen nachgewiesen werden. Dies läßt den Schluß zu, daß ACE möglicherweise ein integraler Bestandteil der Zytoplasmamembran von Spermatozoen ist.

In Seminalplasma von Patienten, das vor und nach Vasektomie erhalten wurde, konnte nach Vasektomie eine signifikante Abnahme der ACE Aktivität nachgewiesen werden. Damit konnte in Übereinstimmung zu vorliegenden Untersuchungen von Hohlbrugger et al. (37), der entsprechende Ergebnisse bei der Ratte erhielt, belegt werden, daß ein Teil der ACE-Aktivität aus dem Hoden und Nebenhoden stammen muß.

Die ACE-Aktivität in Seminalplasma ist zum überwiegenden Teil an makromolekulare Strukturen gebunden, die im Elektronenmikroskop

als Membranvesikel identifiziert werden konnten. Aufgrund der Verteilung der ACE-Aktivität in Seminalplasma und der weitgehenden Assoziation der Enzymaktivität an vesikuläre Strukturen, muß gefolgert werden, daß ein Teil der Vesikel aus dem Hoden und Nebenhoden stammen muß.

Durch Verwendung unterschiedlicher Proteinase-Inhibitoren konnte gezeigt werden, daß sich die katalytischen Eigenschaften von ACE aus Seminalplasma und aus Serum signifikant voneinander unterscheiden. Ebenso unterschiedlich sind die Temperatur-Optima der ACE-Aktivitäten in Seminalplasma und Serum.

Die Einflüsse einer Reihe biologisch aktiver Peptide auf die ACE-Aktivität erbrachten ebenfalls Hinweise auf Unterschiede in den katalytischen Eigenschaften. Da bei diesen Experimenten unphysiologisch hohe Konzentrationen eingesetzt werden mußten, um überhaupt Hemmungen der ACE-Aktivitäten zu erzielen, kann angenommen werden, daß die untersuchten biologischen Peptide keinen regulatorischen Einfluß auf die ACE-Aktivität in Seminalplasma und Serum haben.

9. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Akira, H., Fukuyama, K., Epstein, W.L. (1981)
Angiotensin-converting enzyme measured in mouse tissue by inhibition of histidyl-leucine peptidase
Biochemical Medicine 26: 199-210
2. Alken, C.E., Sökeland, J. (1983)
Urologie
Thieme Verlag, 9. Auflage, pp. 344-345
3. Amann, R.P. (1981)
A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics
J. Androl. 2: 37-41
4. Arregui, A., Lee, C.-M., Emson, P.C., Iversen, L.L. (1979)
Separation of human brain angiotensin-converting enzyme from enkephalin-degrading activity
Eur. J. Pharmac. 59: 141-144
5. Bakhle, Y.S. (1971)
Inhibition of angiotensin I converting enzyme by venom peptides
Br. J. Pharmac. 43: 252-254
6. Bakhle, Y.S. (1972)
Inhibition of converting enzyme by venom peptides
In: Genest, J., Koiw, E. (eds.), Hypertension 72, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 541-547
7. Benuck, M., Marks, N. (1979)
Co-identity of brain-angiotensin-converting enzyme with a membrane bound dipeptidyl carboxypeptidase inactivating met-enkephalin
Biochem. Biophys. Res. Communications 88,1: 215-221

8. Benuck, M., Marks, N. (1980)
Characterization of a distinct membrane bound dipeptidyl carboxypeptidase inactivating enkephalin in brain
Biochem. Biophys. Res. Communications 95: 822-828

9. Bing, J., Poulsen, K., Markussen, J. (1974)
The ability of various insulins and insulin fragments to inhibit the angiotensin I converting enzyme
Acta path. microbiol. scand. Sect. A 82: 777-782

10. Blandau, R.J. (1969)
Gamete transport - comparative aspects
In: Hafez, E.S.E., Blandau, R.J. (eds.), The mammalian oviduct, Univ. of Chicago Press, Chicago, USA, pp. 129-162

11. Caldwell, P.R.P., Seegal, B.C., Hsu, K.C., Das, M., Soffer, R.L. (1976)
Angiotensin-converting-enzyme: vascular endothelial localization
Science 191: 1050-1051

12. Chiu, A.T., Peach, M.I. (1974)
Inhibition of induced aldosterone biosynthesis with a specific antagonist of angiotensin II
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 341-344

13. Craven, D.J., Warren, A.Y., Symonds, E.M. (1981)
Active and inactive renin in human seminal plasma
Arch. of Androl. 7: 63-67

14. Cushman, D.W., Cheung, H.S. (1971)
Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting-enzyme of rabbit lung
Biochem. Pharmac. 20: 1637-1648

15. Dawes, E.A. (1972)
Quantitative Problems in Biochemistry
Churchill Livingstone, Edinburgh & London, 5. Auflage, p. 189

16. Dawes, E.A. (1972)
Quantitative Problems in Biochemistry
Churchill Livingstone, Edinburgh & London, 5. Auflage,
pp. 208-223
17. Dennhardt, R., Haberich, F.J. (1972)
Effects of kallikrein on the absorption of water,
electrolytes and hexoses in the intestine of rats
In: Haberland, G.L., Rohen, J.W. (eds.), Kininogenases-
Kallikrein 1, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York,
pp. 81-89
18. Depierre, D., Bargetzi, J.P., Roth, M. (1978)
Dipeptidyl carboxypeptidase from human seminal plasma
Biochim. Biophys. Acta 523: 469-476
19. Dorer, F.E., Kahn, J.R., Lentz, K.E., Levine, M., Skeggs,
L.T. (1974)
Hydrolysis of bradykinin by angiotensin-converting-enzyme
Circ. Res. 34: 824-827
20. Dott, H.M., Walton, A. (1960)
Effects of dilution and washing on ram spermatozoa studied by
the flow dialyses technique
J. Reprod. Fertil. 1: 350-367
21. Eliasson, R. (1965)
Effect of frequent ejaculations on the composition of human
seminal plasma
J. Reprod. Fertil. 9: 331-336
22. Eliasson, R., Johnsen, O., Lindholmer, C. (1974)
Effects of seminal plasma on some functional properties of
human spermatozoa
In: Mancini, R.E., Martini, L. (eds.), Male fertility and
sterility, New York, Academic Press, Inc., pp. 107-122

23. Elisseeva, Y.E., Orekhovich, V.N., Pavlikhina, L.V., Alexeenko, L.P. (1971)
Carboxy cathepsin - a key of regulatory component of two physiological systems involved in regulation of blood pressure
Clin. Chim. A. 31: 413-416
24. Erdös, E.G. (1970)
Bradykinin, Kallidin and Kallikrein
In: Eichler, O., Farah, A., Herken, H., Welch, A.D. (eds.), Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. XXV, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 427-481
25. Felix, J. (1968)
Einfluß auf Gefäße und Organdurchblutung, Gehirndurchblutung
In: Frey, E.K., Kraut, H., Werle, E. (eds.), Das Kallikrein-Kinin System und seine Inhibitoren, Enke Verlag, Stuttgart, pp. 153-155
26. Ferreira, S.H., Vane, J.R. (1965)
The disappearance of bradykinin and eledoisin in the circulation and vascular beds of the cat
Br. J. Pharmacol. Chemoth. 30: 417-424
27. Ferris, T.F. (1972)
Uterine blood flow and uterine renin secretion
J. Clin. Invest. 51: 2827-2833
28. Franklin, G.O. (1974)
The effect of angiotensin II intravenous infusion on plasma renin activity and prostaglandins A, E and F levels in the uterine vein of the pregnant monkey
Prostaglandins 6: 271-280
29. Frey, E.K., Kraut, H. (1928)
Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung
Arch. Exp. Path. Pharmacol. 133: 1-56

30. Giertz, H. (1980)
Histamin, 5-Hydroxytryptamin, Kinine, Slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A), Prostaglandine
In: Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. (eds.), Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Bibliographisches Institut, 3. Auflage, pp. 152-155
31. Golenhofen, K. (1968)
Einfluß auf Gefäße und Organdurchblutung, Haut- und Muskeldurchblutung
In: Frey, E.K., Kraut, H., Werle, E. (eds.), Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren, Enke Verlag, Stuttgart, pp. 149-153
32. Gorenstein, C., Snyder, S.H. (1979)
Two distinct enkephalinases: Solubilization, partial purification and separation from angiotensin-converting enzyme
Life Sci. 25: 2065-2070
33. Granier, C., Van Rietschoten, J., Kitabgi, P., Poustis, C., Freychet, P. (1982)
Synthesis and characterization of neurotensin analogues for structure/Activity relationship studies
Eur. J. Biochem. 124: 117-125
34. Harrison, R.A.P., White, I.G. (1972)
Some methods for washing spermatozoa from bull, boar and ram: a comparison using biochemical and other criteria
J. Reprod. Fertil. 29: 271-284
35. Harrison, R.A.P., White, I.G. (1972)
Glycolytic enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull, boar and ram, and their leakage after shock
J. Reprod. Fertil. 30: 105-115

36. Heberer, G., Köle, W., Tscherne, H. (1983)
Chirurgie
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 4. Auflage,
p. 546
37. Hohlbrugger, G., Schweisfurth, H., Dahlheim, H. (1980)
Angiotensin I converting enzyme in rat testis, epididymis and
vas deferens under different conditions
J. Reprod. Fertil. 65: 97-103
38. Hohlbrugger, G., Schweisfurth, H., Knonsalla, M., Dahlheim,
H. (1980)
Experimental approach to the physiological role of gonadal
angiotensin I converting enzyme
Pflügers Archiv 384: R 28
39. Hohlbrugger, G., Pschorr, J., Dahlheim, H. (1984)
Angiotensin I converting enzyme in the ejaculate of fertile
and infertile men
Fertility and Sterility 41,2: 324-325
40. Hudgin, R.L., Charleson, S.E., Zimmerman, M., Mumford, R.,
Wood, P.L. (1981)
Enkephalinase: Selective peptide inhibitors
Life Sciences 29: 2593-2601
41. Igic, R., Erdös, E.G., Yeh, H.S.J., Sorrels, K., Nakajima, T.
(1972)
Angiotensin I converting enzyme of the lung
Circ. Res. 31,2: 51-61
42. Inagami, T., Takahashi, N., Yokosawa, N., Tokii, Y. (1979)
Partial purification of prorenin and activating by
kallikrein: A possible new link between renin and kallikrein
system
Advances Exp. Med. Biol. 120 B: 415-428

43. Kaneko, S. (1976)
Vortrag auf dem 48. Kongreß der Biochemischen Gesellschaft
Japan, Sapparo, Japan
44. Kato, H., Suzuki, T. (1971)
Bradykinin-potentiating peptides from the venom of
Agkistrodon halys blomhoffii. Isolation of five bradykinin
potentiators and the amino acid sequences of two of them,
potentiators B and C
Biochemistry 10: 972-980
45. Kato, H., Suzuki, T. (1971)
Structure of bradykinin-potentiating peptide containing
tryptophan from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*
Experientia 26: 1205-1206
46. Kato, H., Suzuki, T., Okada, K., Kimura, T., Sakakibara, S.
(1973)
Structure of potentiator A, one of the five bradykinin
potentiating peptides from the venom of *Agkistrodon halys*
blomhoffii
Experientia 29: 574-575
47. Kato, H., Suzuki, T. (1976)
Chemistry and biology of the kallikrein system in health and
disease
Fogarthy Int. Cent. Proc. 27, Washington D.C., USGPO, In
Press
48. Kettner, C., Shaw, E. (1981)
Inactivation of trypsin-like enzymes with peptides of
arginine chloromethyl ketone
Methods Enz. 80: 826-842
49. Kienitz, Th., Schill, W.-B. (1977)
Orale Kallikrein - Therapie der Asthenozoospermie
Fortschr. der Med. 95: 2102-2105

50. Komiyama, T., Suda, H., Aoyagi, T., Takeuchi, T., Umezawa, H., Fujimoto, K., Umezawa, S. (1975)
Studies on inhibitory effect of phosphoramidon and its analogs on thermolysin
Arch. Biochem. Biophys. 171: 727-731
51. Krassnigg, F., Niederhauser, H., Toepfer-Petersen, E., Schill, W.-R. (1984)
Investigations of the functional role of angiotensin-converting enzyme (ACE) in human seminal plasma
Kinin 1984, Internationaler Kongreß, Savannah, USA, (Abstr.)
52. Krassnigg, F., Niederhauser, H., Toepfer-Petersen, E., Schill, W.-R. (1984)
Properties of angiotensin-converting enzyme (ACE) from human seminal plasma
European Sterility Congress, Monte Carlo, (Abstr.)
53. Kraus, R., Engl, R., Frick, J., Krassnigg, F., Schill, W.-B. (1984)
Functional role and origin of angiotensin-converting enzyme (ACE) in human seminal plasma
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chemie 365: 928
54. Liebermann, J. (1975)
Elevation of serum angiotensin-converting enzyme (ACE) level in sarcoidosis
Am. J. Med. 59: 365-372
55. Lineweaver, H., Burk, D. (1934)
The determination of enzyme dissociation constants
J. Am. Chem. Soc. 56: 658-666
56. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., (1951)
Protein measurement with the folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193: 265-275

57. Mann, T., (1951)
Studies on the metabolism of semen: 7. cytochrome in human spermatozoa
Biochem. J. 48: 386-388
58. Meng, K., Haberland, G.L. (1973)
Influence of kallikrein on glucose transport in the isolated intestine
In: Haberland, G.L., Rohen, J.W. (eds.), Kininogenases-Kallikrein 1, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, pp. 75-81
59. Mizutani, T., Schill, W.-B. (1985)
Motility of seminal plasma-free spermatozoa in the presence of several physiological compounds
Andrologia 17(2): 150-156
60. Moriwaki, C., Moriya, Y., Yamaguchi, K., Kizuki, K., Fujimori, H. (1973)
Intestinal absorption of pancreatic kallikrein and some aspects of its physiological role
In: Haberland, G.L., Rohen, J.W. (eds.), Kininogenases-Kallikrein, Schattauer Verlag, Stuttgart-New-York, pp. 57-66
61. Mumford, R.A., Strauss, A.W., Powers, J.C., Pierzchala, P.H., Nishino, N., Zimmerman, M. (1980)
A zinc metalloendopeptidase associated with dog pancreatic membranes
J. Biol. Chem. 255: 2227-2230
62. Munoz, J.M., Braun-Menendez, E., Fasciolo, J.C., Leloir, L.F. (1940)
Mechanism of renal hypertension
Am. J. M. Sc. 200: 608-618
63. Niederhauser, H., Maier, I., Turlakidou, S., Krassnigg, F., Schill, W.-B. (1984)
Distribution of functional proteins in human seminal plasma
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 365: 936

64. Ohara, I. (1977)
The effect of kallikrein in body fluid circulation
In: Haberland, G.L., Rohen, J.W., Suzuki, T. (eds.),
Kininogenases-Kallikrein 4, Schattauer Verlag, Stuttgart-New
York, pp. 321-331
65. Ondetti, M.A., Cushman, D.W. (1982)
Enzymes of the renin-angiotensin-system and their inhibitors
Ann. Rev. Biochem. 51: 284-285
66. Ondetti, M.A., Cushman, D.W. (1982)
Enzymes of the renin-angiotensin-system and their inhibitors
Ann. Rev. Biochem. 51: 283-308
67. Oparil, S., Low, J., Koerner, T.J. (1976)
Altered angiotensin I conversion in pulmonary disease
Clin. Sci. and Molecular Med. 51: 537-543
68. Oshima, G., Gecse, A., Erdös, E.G. (1974)
Angiotensin I converting enzyme of the kidney cortex
Biochim. Biophys. Acta 350: 26-37
69. Piquillourd, D.Y., Reinhartz, A., Roth, M. (1970)
Studies on angiotensin-converting-enzyme with different
substrates
Biochim. Biophys. Acta 206: 136-142
70. Placzek, R., Engl, R., Krassnigg, F., Schill, W.-B. (1984)
Factors influencing the motility of human spermatozoa in
vitro
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chemie 365: 939
71. Rabes, H. (1975)
Influence of kallikrein on proliferation of liver cells in
vivo and in vitro
In: Haberland, G.L., Rohen, J.W., Blümel, G., Huber, P.
(eds.), Kininogenases-Kallikrein 3, Schattauer Verlag,
Stuttgart-New York, pp. 137-146

72. Rixon, R.H., Whitefield, J.F. (1972)
Kallikrein, kinin and cell proliferation
In: Haberland, G.L., Rohen, J.W. (eds.), Kininogenases-Kallikrein 1, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, pp. 131-145
73. Rohen, J.W. (1978)
Der Einfluß des Kallikrein-Kinin-Systems auf die Spermatogenese
Fortschr. Androl. 6: 16-25
74. Rohen, J.W., Stuttmann, R. (1977)
The early postnatal development of the germinative epithelium of the testis in the albino rat under the influence of kallikrein
In: Haberland, G.L., Rohen, J.W., Suzuki, R. (eds.), Kininogenases-Kallikrein 4, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, pp. 217-223
75. Ronquist, G., Brody, I. (1985)
The prostasome: its secretion and function in man
Biochim. Biophys. Acta 822: 203-218
76. Ronquist, G., Brody, I., Gottfries, A., Stegmayr, B. (1978)
An Mg^{2+} and Ca^{2+} -stimulated adenosine triphosphatase in human prostatic fluid
Andrologia 10: part I 261-272, part II 427-433
77. Ryan, J.W., Roblero, J., Stewart, J.M. (1970)
Inactivation of bradykinin in rat lung
Adv. Exp. Med. Biol. 8: 263-271
78. Ryan, J.W., Ryan, U.S., Schultz, D.R., Whitaker, C., Chung, A., Dorer, F.E. (1975)
Subcellular localization of pulmonary angiotensin converting enzyme (Kininase II)
Biochem. J. 146: 497-499

79. Schill, W.-B., Haberland, G.L. (1974)
Kinin - induced inhancement of sperm motility
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 335: 229-231
80. Schill, W.-B. (1978)
Klinische Erfahrungen mit Kallikrein bei der Therapie der
Oligo- und Asthenozoospermie
Fortschr. Androl. 6: 52-72
81. Schill, W.-B. (1982)
Medical treatment of idiopathic normogonadotropic
oligozoospermia
Int. J. Androl. 5: 135-153
82. Schill, W.-B. (1984)
Protides of the biological fluids
Kongreß Brüssel, (Poster)
83. Schirren, C. (1982)
Praktische Andrologie
Hartmann Verlag, Berlin, 2. Auflage, pp. 25-26
84. Schirren, C. (1982)
Praktische Andrologie
Hartmann Verlag, Berlin, 2. Auflage, p. 34
85. Schweisfurth, H. (1980)
Das Angiotensin-I-converting-enzyme bei verschiedenen
Erkrankungen
Med. Welt 31: 1758 1759
86. Senior, J. (1974)
The kallikrein-kinin-system and parturition in the rat
In: Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C., Huber, P.
(eds.), Kininogenases-Kallikrein 2, Schattauer Verlag,
Stuttgart-New York, pp. 41-45

87. Silverstein, E., Friedland, J., Lyons, H.A., Gourin, A. (1976)
Markedly elevated angiotensin converting enzyme in lymph nodes containing non-necrotizing granulomas in sarcoidosis
Proc. Natl. Acad. Sci. 73: 2137-2141
88. Silverstein, E., Pertschuk, L.P., Friedland, J. (1979)
Immunofluorescent localization of angiotensin I converting enzyme in epithelioid and giant cells of sarcoidosis granulomas
Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 6646-6648
89. Skeggs, L.T., Marsh, W.H., Kahn, J.R., Shumway, N.P. (1954)
The existence of two forms of hypertensin
J. Exp. Med. 99: 275-282
90. Skeggs, L.T., Marsh, W.H., Kahn J.R., Shumway, N.P. (1954)
Purification of hypertensin
J. Exp. Med. 100: 363-370
91. Skeggs, L.T., Marsh, W.H., Kahn, J.R., Shumway, N.P. (1955)
Amino acid composition and elektrophoretic properties of hypertensin I
J. Exp. Med. 102: 435-440
92. Skeggs, L.T., Dorer, F.E., Kahn, J.R., Lentz, K.E., Levine, M. (1974)
The biological production of angiotensin
In: Page, I.H., Bumpus, F.M. (eds.), Angiotensin, Springer Verlag, New York, pp. 1-16
93. Skinner, S.L., Cran, E.J., Gibson, R., Taylor, R., Walters, W.A.W., Cott, K.J. (1975)
Angiotensins I and II, active and inactive renin, renin substrate, renin activity, and angiotensinase in human liquor amnii and plasma
Amer. J. Obstet. Gynaec. 121: 626-630

94. Soffer, R.L., Reza, R., Choudhury, P.R.B. (1974)
Angiotensin-converting-enzyme from rabbit pulmonary
particles
Proc. Natl. Acad. Sci. 71: 1720-1724
95. Soffer, R.L. (1976)
Angiotensin-converting-enzyme and the regulation of
vasoactive peptides
Ann. Rev. Biochem. 45: 73
96. Soffer, R.L. (1976)
Angiotensin-converting-enzyme and the regulation of
vasoactive peptides
Ann. Rev. Biochem. 45: 78-81
97. Stegmayr, B., Ronquist, G. (1982)
Promotive effect of human sperm progressive motility by
prostasomes
Urol. Res. 10: 253-257
98. Stegmayr, B., Berggren, P.O., Ronquist, G., Hellman, B.
(1982)
Calcium, magnesium, and zinc contents in organelles of
prostatic origin in human seminal plasma
Scand. J. Urol. Nephrol: 199-203
99. Steigleder, G.K. (1979)
Dermatologie und Venerologie
Thieme Verlag, 3. Auflage, p. 533
100. Stevens, R.L., Micalizzi, E.R., Fessler, D.C., Pals, D.T.,
(1972)
Angiotensin I converting enzyme of calf lung: Method of
assay and partial purification
Biochem. 11: 2999-3007

101. Stüttgen, G. (1973)
Clinical substantiation of the effect of kallikrein
In: Haberland, G.L., Rohen, J.W. (eds.), Kininogenases-
Kallikrein 1, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York,
pp. 189-193
102. Sullivan, S., Akil, H., Blacker, P., Barchas, J.D. (1980)
Enkephalinase: selective inhibitors and partial
characterization
Peptides 1: 31-35
103. Swerts, J.P., Perdrisot, R., Malfroy, B., Schwartz, J.C.
(1979)
Is enkephalinase identical with angiotensin-converting
enzyme?
Eur. J. Pharmac. 53: 209-210
104. Terragno, N.A., Pacholczyk, D., McGiff, J.C. (1974)
Prostaglandins and the regulations of uterine blood flow in
pregnancy
Nature 249: 57-58
105. Tigerstedt, R., Bergman, P.G. (1898)
Niere und Kreislauf
Skand. Arch. Physiol. 8: 223-271
106. Tscheche, H., Mair, G., Godec, G. (1979)
The primary structure of porcine glandular kallikreins
Adv. Exp. Med. Biol. 120 A: 245-260
107. Ueda, E., Kobubo, T., Akatsu, H., Yamamura, Y. (1971)
Inhibition of angiotensin I converting enzyme and kininase
in rabbit plasma by bradykinin potentiating peptide B (Pyr-
Gly-Leu-Pro-Pro-Arg-Pro-Lys-Ile-Pro-Pro)
Exp. 27: 1020-1021

108. Venuto, R.C. (1975)
Uterine prostaglandin E secretion and uterine blood flow in the pregnant rabbit
J. Clin. Invest. 55: 193-197
109. Wallner, O., Schill, W.-B., Grösser, A., Fritz, H. (1975)
Participation of the kallikrein-kinin-system in sperm penetration through cervical mucus: In vitro studies
In: Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C., Huber, P. (eds.), Kininogenases-Kallikrein 2, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, pp. 63-70
110. Werle, E., Götz, W., Keppler, A. (1937)
Über die Wirkung des Kallikreins auf den isolierten Darm und über eine darmkontrahierende Substanz
Biochem. Z. 289: 217-233
111. Werle, E., Multhaupt, G. (1968)
Einfluß auf Gefäße und Organdurchblutung, Haut- und Muskeldurchblutung
In: Frey, E.K., Kraut, H., Werle, E. (eds.), Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren, Enke Verlag, Stuttgart, pp. 149-153
112. White, I.G. (1953)
The effect of washing on the motility and metabolism of ram, bull, and rabbit spermatozoa
J. Exp. Biol. 30: 200-213
113. Wissenschaftliche Tabellen Geigy (1980)
Teilband Statistik. 8. Auflage, Basel
114. Yang, H.Y.T., Erdös, E.G., Levin, Y. (1971)
Characterization of a dipeptide hydrolase (Kininase II: angiotensin I converting enzyme)
J. Pharmac. Exp. Ther. 117: 291-300

115. Yokohama, M., Hiwada, K., Kobubu, T., Takaha, M., Takeuchi, M. (1980)
Angiotensin-converting enzyme in human prostate
Clin. Chim. Acta 100: 253-258

10. D A N K S A G U N G

Herrn Prof. Dr. med. W.-B. Schill bin ich für die Überlassung des Themas der Dissertation, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die ständige Unterstützung und hilfreichen Ratschläge zu großem Dank verpflichtet.

Besonders erwähnen möchte ich die Hilfsbereitschaft und Aufgeschlossenheit von Herrn Dr. phil. nat. F. Krassnigg, ohne dessen Kooperation sowie stete und geduldige Diskussionsbereitschaft die Arbeit sehr erschwert gewesen wäre.

Bei Problemen technischer Art unterstützten mich freundlicherweise Frau M. Feifel, Frau A. Weiss und Frau A. Spitzauer.

11. L E B E N S L A U F

Ich, Harald Peter Niederhauser, wurde am 19. April 1961 als Sohn des Fahrlehrers Peter Niederhauser und seiner Frau Ingrid Niederhauser, geb. Gaerner, in München geboren. Die Grundschule sowie das Werner-Heisenberg-Gymnasium und Rupprecht-Gymnasium besuchte ich in München von 1967 bis 1980.

Vom 1. Juli 1980 bis 31. September 1980 leistete ich einen Teil meines Grundwehrdienstes als Sanitätssoldat ab.

Am 17. September 1980 wurde ich zum Hochschulstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München für das Fach Humanmedizin zugelassen.

Am 24. August 1982 legte ich die Ärztliche Vorprüfung in München ab. Am 19. August 1983 bestand ich den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in München. Den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestand ich am 23. August 1985 in München.

Seit Juni 1983 bin ich Doktorand im andrologischen Labor der Dermatologischen Universitätsklinik München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. W.-B. Schill.

Meine Approbation als Arzt erhalte ich voraussichtlich im Herbst 1986.

